

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7659550号
(P7659550)

(45)発行日 令和7年4月9日(2025.4.9)

(24)登録日 令和7年4月1日(2025.4.1)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
請求項の数 20 (全55頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-523915(P2022-523915)	(73)特許権者	507159304
(86)(22)出願日	令和2年10月23日(2020.10.23)		シャイアー ヒューマン ジェネティック
(65)公表番号	特表2022-553083(P2022-553083 A)		セラピーズ インコーポレイテッド
(43)公表日	令和4年12月21日(2022.12.21)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/056984		2 4 2 1 レキシントン シャイアー ウ
(87)国際公開番号	WO2021/081280	(74)代理人	エイ 3 0 0
(87)国際公開日	令和3年4月29日(2021.4.29)		100078282
審査請求日	令和5年10月20日(2023.10.20)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	62/924,877	(74)代理人	100113413
(32)優先日	令和1年10月23日(2019.10.23)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アデノ随伴ウイルスベクターに基づく遺伝性血管浮腫のための遺伝子治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

AAV8カプシド、5'および3'末端逆位反復(I T R)配列、該配列の上流のイントロン、トランスサイレチン(T T R)プロモーターである肝臓特異的プロモーター、配列番号5、7、または13のいずれか1つの配列を有するC1インヒビター(C 1 - I N H)をコードするコドン最適化S E R P I N G 1配列、シス作用調節モジュール(C R M)、並びにW P R E配列を含む、組み換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ベクター。

【請求項2】

前記W P R E配列が配列番号23のW P R E 3である、請求項1に記載のr A A Vベクター。

【請求項3】

前記W P R Eがmut6delATGの改変を含有し、前記mut6delATGの改変を含有する前記W P R Eが、配列番号24と同一の配列を含む、請求項1に記載のr A A Vベクター。

【請求項4】

前記イントロンが、マウス微小ウイルス(M V M)イントロンまたはS V 4 0イントロンである、請求項1に記載のr A A Vベクター。

【請求項5】

前記C R Mが肝臓特異的C R Mである、請求項1に記載のr A A Vベクター。

【請求項6】

前記CRMがCRM8である、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項7】

前記ベクターが少なくとも3つのCRMを含む、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項8】

前記SERPING1配列が、野生型配列またはコドン最適化配列である、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項9】

前記コドン最適化SERPING1配列が、配列番号5、7、または13のいずれか1つの配列を有する、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項10】

遺伝性血管浮腫(HAE)を有する対象を治療するための、請求項1~9のいずれか1項に記載のrAAVベクターを含む組成物。

【請求項11】

遺伝性血管浮腫(HAE)を有する対象を治療するための組成物であって、前記組成物は、組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを含み、前記組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターは、AAV8カプシドと、C1インヒビター(C1-INH)をコードする配列番号4~17のいずれか1つの配列を有する核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとを含み、前記組成物の投与により、前記対象のC1-INH活性が増加することを特徴とする、前記組成物。

【請求項12】

前記C1-INHが、前記対象の血漿中で検出される、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記C1-INHが、前記対象の肝臓中で検出される、請求項10~12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

C1-INHが、単回投与後、少なくとも30、60、90、120、150、または180日、維持される、請求項10~13のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

C1-INH活性が、前記rAAVベクターの投与後、前記対象に存在する、請求項10~14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項16】

前記対象が、発作前のレベルに回復したC4レベルを有する、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

前記組成物が静脈内投与されることを特徴とする、請求項10~16のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項18】

前記組成物が髄腔内投与されることを特徴とする、請求項10~16のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項19】

前記AAVが少なくとも約 5×10^9 v gの用量で投与されることを特徴とする、請求項17または18に記載の組成物。

【請求項20】

前記組成物の前記投与が免疫応答を誘起しないことを特徴とする、請求項10~19のいずれか1項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年10月23日に出願された米国特許仮出願第62/924,87

10

20

30

40

50

7号の優先権を主張するものであり、その開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

遺伝性血管浮腫（HAE）は、顔、喉、及びほとんどの四肢で腫脹が繰り返して発生することを特徴とする稀な状態である。HAEは、生命を脅かす可能性のある障害であり、皮下及び粘膜下の血管性浮腫として現れる、血管拡張による予測不可能な再発性の発作を特徴とする。HAEは、ある場合には、血漿中のC1-インヒビターのレベルが低いことに関連しており（I型）、他の場合には、当該タンパク質が正常な量または多量で循環しているが、機能不全である場合がある（II型）。C1インヒビターは、血漿カリクレイン活性の主な調節因子である。HAE発作の症状には、顔、口及び/または気道の腫脹が含まれ、自然に発生するか、または軽度の外傷によって誘発される。気道に影響する浮腫性発作は、命にかかわることもある。急性炎症性発作に加えて、過剰な血漿カリクレイン活性は、紅斑性狼瘡を含む自己免疫疾患などの慢性状態にも関連している。

10

【0003】

C1-INHの欠損または機能不全の治療に対しては、例えば、接触系のメンバーを阻害することを含め、様々な戦略が企図され開発されている。例えば、ラナデルマブは、血漿カリクレインの完全ヒトモノクローナル抗体インヒビターであり、HAEの治療に承認されている。

【0004】

疾患の治療には、*in vivo*でタンパク質を産生するベクターの使用が望ましいが、対象への送達後のタンパク質産生が不十分であることなどの様々な要因によって制限されている。

20

【0005】

現在まで、利用可能な治療法は、疾患の再発及び長期間の連続投与の必要性を含む課題には対処していない。したがって、HAEを治療するための新規かつ持続的な治療アプローチが求められている。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、*in vivo*で効率的かつロバストなヒトC1エステラーゼインヒビター（C1-INHまたはC1EI）の発現を可能にする、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターを提供する。

30

【0007】

一態様において、本発明は、とりわけ、AAV8カプシドと、C1インヒビター（C1-INH）をコードするコドン最適化SERPING1配列とを含む、組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターを提供する。

【0008】

いくつかの実施形態において、C1-INHをコードするコドン最適化SERPING1配列は、配列番号2に対して、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有する配列を含む。

40

【0009】

いくつかの実施形態において、C1-INHをコードするコドン最適化SERPING1配列は、配列番号2と同一の配列を含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、ベクターは、肝臓特異的プロモーターを更に含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、肝臓特異的プロモーターは、トランスサイレチンプロモーター（TTR）である。

【0012】

いくつかの実施形態において、ベクターは、ユビキタスプロモーターを更に含む。

50

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、ベクターは、次のうちの1つ以上：5'及び3'末端逆位反復、配列上流のイントロン、ならびにシス作用調節モジュール(CRM)を更に含む。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、ベクターは、WPRE配列を更に含む。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態において、WPRE配列は、改変されている。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態において、WPREは、mut6delATGの改変を含有する。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態において、イントロンは、マウス微小ウイルス(MVM)イントロンまたはSV40イントロンである。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、CRMは、肝臓特異的CRMである。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態において、CRMは、CRM8である。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、ベクターは、少なくとも3つのCRMを含む。

【 0 0 2 1 】

別の態様において、本発明は、とりわけ、AAV8カプシドと、rAAVベクターとを含む、組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を提供し、ベクターは、

- a. 5'末端逆位反復(ITR)、
- b. シス作用調節モジュール(CRM)、
- c. 肝臓特異的プロモーター、
- d. マウス微小ウイルス(MVM)、
- e. C1インヒビター(C1-INH)をコードするSERPING1配列、
- f. ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)、及び
- g. 3' ITR

を含む。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、SERPING1配列は、野生型配列またはコドン最適化配列である。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態において、コドン最適化SERPING1配列は、配列番号2と、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する。

【 0 0 2 4 】

別の態様において、本発明は、とりわけ、遺伝性血管浮腫(HAE)を有する対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、先行実施形態のいずれか1つのrAAVを投与することを含む、方法を提供する。

【 0 0 2 5 】

別の態様において、本発明は、とりわけ、遺伝性血管浮腫(HAE)を有する対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、AAV8カプシドと、C1インヒビター(C1-INH)をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとを含む組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを投与することを含み、投与することにより、対象のC1-INH酵素活性が増加する、方法を提供する。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、C1-INHは、対象の血漿中で検出される。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、C1-INHは、対象の肝臓中で検出される。

10

20

30

40

50

【0028】

いくつかの実施形態において、C1-INHは、単回投与後、少なくとも30、60、90、120、150、180日またはそれ以上、維持される。

【0029】

いくつかの実施形態において、C1-INH活性は、rAAVベクターの投与後、対象に存在する。

【0030】

いくつかの実施形態において、対象は、発作前のレベルに回復したC4レベルを有する。

【0031】

いくつかの実施形態において、AAVは、静脈内投与される。

10

【0032】

いくつかの実施形態において、AAVは、髄腔内投与される。

【0033】

いくつかの実施形態において、AAVは、少なくとも約 5×10^9 v gの用量で投与される。

【0034】

いくつかの実施形態において、rAAVの投与は、免疫応答を誘起しない。

【0035】

本発明の様々な態様が以下のセクションにおいて詳細に記載される。セクションの使用は、本発明を限定することを意味するものではない。各セクションは、本発明のいかなる態様にも適用することができる。本出願において、「または」の使用は、別段の指示がない限り、「及び/または」を意味する。本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈により別途明示される場合を除き、単数と複数の両方の指示対象を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】Aは、野生型のヒトC1-INH(hC1-INH)発現ベクターを含む発現カセットの模式図である。Bは、肝臓(肝細胞)におけるhC1-INH発現のために設計された発現カセットの模式図である。ITR:末端逆位反復;hTTR:ヒトトランスサイレチンプロモーター;CRM:シス作用調節モジュール;イントロンはMVMイントロン(マウス微小ウイルスイントロン)であり得る;polyAは上流エンハンサーである。

30

【図2A】Mコンストラクトの全般的な模式図である。Mコンストラクトは、HA01(SERPING1)配列を有する対照コンストラクトである。HA01は、ヒトSERPING1野生型配列であり、1503bp、24のCpG、及び53.4%のGC含量を有する。

【図2B】2つのMコンストラクト:M01及びM01Aを示す。M01は、HA01(SERPING1)配列及びエクソン1-イントロン1-部分的エクソン2(717bp)イントロンを含み、一方、Mar01Aは、HA01(SERPING1)配列及びMVM(77bp)イントロンを含む。

【図3】Aは、Jコンストラクトの全般的な模式図である。Jコンストラクトは、4つのコドン最適化SERPING1配列を含む。Bは、4つのJコンストラクト:J01、J02、J03、及びJ04の模式図を示す。J01は、コドン最適化SERPING1配列HA03を含む。J02は、コドン最適化SERPING1配列HA06を含む。J03は、コドン最適化SERPING1配列HA05を含む。J04は、コドン最適化SERPING1配列HA04を含む。

40

【図4A】Sコンストラクトの全般的な模式図である。Sコンストラクトは全て、イントロンとWPREの組み合わせが異なるコドン最適化HA06(SERPING1)配列を含む。イントロンは、MVMイントロンまたはエクソン1-イントロン1-部分的エクソン2のいずれかを含む。

【図4B】9つのSコンストラクト:S01、S02、S03、S04、S05、S06

50

、S07、S08、及びS09の模式図を示す。

【図5A】Nコンストラクトの全般的な模式図である。全てのNコンストラクトは、コドン最適化HA06 (SERPING1) 配列及び新規プロモーターエレメントを含む。

【図5B】9つのNコンストラクト：N01、N02、N03、N04、N05、N06、N07、N08、及びN09の模式図を示す。

【図6A】Uコンストラクトの全般的な模式図である。Uコンストラクトは、WPREmut6delATGと組み合わせた異なるコドン最適化SERPING1配列を含む。

【図6B】10個のUコンストラクト：U01、U02、U03、U04、U05、U06、U07、U08、U09、及びU10の模式図を示す。U01は、コドン最適化SERPING1配列HA11を含む。U02は、コドン最適化SERPING1配列HA12を含む。U03は、コドン最適化SERPING1配列HA13を含む。U04は、コドン最適化SERPING1配列HA14を含む。U05は、コドン最適化SERPING1配列HA15を含む。U06は、コドン最適化SERPING1配列HA16を含む。U07は、コドン最適化SERPING1配列HA17を含む。U08は、コドン最適化SERPING1配列HA18を含む。U09は、コドン最適化SERPING1配列HA19を含む。U10は、コドン最適化SERPING1配列HA20を含む。

【図7A】Pコンストラクトの全般的な模式図である。Pコンストラクトは全て、異なる新規プロモーターエレメントと組み合わせたコドン最適化HA06 (SERPING1) 配列及びWPREmut6delATGを含む。新規プロモーターエレメントは、CRE4、CRE6、またはCRE4及びCRE6を含む。

【図7B】6つのPコンストラクト：P01、P02、P03、P04、P05、及びP06の模式図を示す。

【図8】Aは、HepG2細胞におけるAAV8・SERPING1ベクターによるhC1-INHの発現を示すウェスタンブロットの画像である。Bは、ELISAアッセイによって測定された、HepG2細胞におけるAAV8・SERPING1による機能的C1-INHの発現を示す実験データのグラフである。

【図9】Aは、野生型C57Bl/6アルビノマウスにAAV8・SERPING1ベクターを単回静脈内投与した後のhC1-INHの用量依存的発現を示す実験データのグラフである。注射後14日目に、血漿中のhC1-INHのレベルが測定された。Bは、野生型C57Bl/6アルビノマウスにAAV8・SERPING1ベクターを単回静脈内投与した後のhSERPING1 DNAまたはRNAの用量依存的発現を示す実験データのグラフである。注射後28日目に、肝臓中のhC1-INHのレベルが測定された。hSERPING1 DNAの発現レベルは、コピー/μg及びコピー/細胞で表される。

【図10】Aは、野生型C57Bl/6アルビノマウスに異なるベクターを単回静脈内投与した後の血漿中のC1-INHの発現における、4つのコドン最適化SERPING1コンストラクト (J01、J02、J03、及びJ04) を含むrAAV8ベクターのin vivo有効性を示す実験データのグラフである。注射後7、14及び28日目に、hC1-INHの発現レベルが測定された。M01Aコンストラクトが対照として使用された。Bは、本試験で使用された異なるコンストラクトの模式図を示す。

【図11】野生型C57Bl/6アルビノマウスにベクターを単回静脈内投与した後の血漿中のC1-INHの発現における、コドン最適化SERPING1配列及びWPREを含むrAAV8ベクターのin vivo有効性を示す実験データのグラフである。注射後7、14及び28日目に、hC1-INHの発現レベルが測定された。ベクター単回用量 4×10^{11} vg/kgが投与された。

【図12】Aは、C57Bl/6アルビノマウスにベクターを単回静脈内投与した後の血漿中のC1-INHの発現における、HA06 (SERPING1) 配列、異なるWPRE及びイントロンを含むrAAV8ベクターのin vivo有効性を示す実験データのグラフである。注射後7、14及び28日目に、hC1-INHの発現レベルが測定された。Bは、本試験で使用された異なるコンストラクトの模式図を示す。

【図13】Aは、C57Bl/6アルビノマウスに 4×10^{11} vg/kgの用量でベク

10

20

30

40

50

ターを単回静脈内投与した後の血漿中のC1-INHの発現における、HA06(SERPING1)配列、WP RE及び異なるプロモーターエレメントを含むrAAV8ベクターの*in vivo*有効性を示す実験データのグラフである。注射後7、14及び28日目に、hC1-INHの発現レベルが測定された。Bは、本試験で使用された異なるコンストラクトの模式図を示す。Cは、C57Bl/6アルビノマウスに低用量(2×10^{12} vg/kg)及び高用量(2×10^{13} vg/kg)でコンストラクトを静脈内投与した後の血漿中のC1-INHの発現における、HA06(SERPING1)配列、WP RE mut6 del ATG及びMVMイントロンを含むコンストラクトであるS04の用量依存的な有効性を示す実験データのグラフである。注射後14日目及び28日目に、hC1-INHの発現レベルが測定された。Cには、S04の模式図が示される。

10

【図14】Aは、C57Bl/6アルビノマウスに 2×10^{12} vg/kgの用量でベクターを単回静脈内投与した後の血漿中のC1-INHの発現における、コドン最適化SERPING1配列を含むrAAV8ベクターの*in vivo*有効性を示す実験データのグラフである。注射後28日目に、hC1-INHの発現レベルが測定された。コドン最適化SERPING1配列を含むベクターの発現レベルと同じ用量のS04コンストラクトの発現レベルと比較した。Bは、本試験で使用された異なるコンストラクトの模式図を示す。

【図15】Aは、C57Bl/6アルビノマウスに中用量のベクターを単回静脈内投与した後の血漿中のC1-INHの発現における、HA06(SERPING1)配列を異なるWP RE及び新規プロモーターエレメントと組み合わせる含むrAAV8ベクターの*in vivo*有効性を示す実験データのグラフである。注射後7、14、28、49、70、91、112、133、152、及び175日目に、hC1-INHの発現レベルが測定された。Bは、本試験で使用された異なるコンストラクトの模式図を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0037】

定義

アデノ随伴ウイルス(AAV)：本明細書で使用される場合、「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」または組み換えAAV(「rAAV」)という用語には、AAVタイプ1、AAVタイプ2、AAVタイプ3(タイプ3A及び3Bを含む)、AAVタイプ4、AAVタイプ5、AAVタイプ6、AAVタイプ7、AAVタイプ8、AAVタイプ9、AAVタイプ10、AAVタイプ11、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、及びヒツジAAVが含まれるが、これらに限定されない(例えば、Fields et al., *Virology*, volume 2, chapter 69(4th ed., Lippincott-Raven Publishers); Gao et al., *J. Virology* 78:6381-6388(2004); Mori et al., *Virology* 330:375-383(2004)参照)。典型的に、AAVは、分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染し得、宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく染色体外に存在することができる。AAVベクターは、遺伝子治療によく使用される。

30

【0038】

投与：本明細書で使用される場合、「投与すること」、または「導入すること」という用語は、治療薬をコードするrAAVベクターを、rAAVベクターの送達をもたらす方法または経路によって対象に送達するという文脈において、区別なく使用される。rAAVベクターを投与するための方法は、例えば、静脈内、皮下または経皮を含め、様々な方法が当該技術分野において知られている。rAAVベクターの経皮投与は、「遺伝子銃」またはバイオリスティック粒子送達システムを使用して行うことができる。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、非ウイルス性脂質ナノ粒子を介して投与される。

40

【0039】

動物：本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、動物界の任意の一員を指す。いくつかの実施形態において、「動物」は、あらゆる発達段階のヒトを指す。いくつかの実施形態において、「動物」は、あらゆる発達段階の非ヒト動物を指す。ある特定の实

50

施形態において、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び/またはブタ）である。いくつかの実施形態において、動物には、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫、及び/または蠕虫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、及び/またはクローンであり得る。

【0040】

およそまたは約：本明細書で使用される場合、「およそ」または「約」という用語は、1つ以上の目的とする値に適用される場合、指定された参照値と同様である値を指す。ある特定の実施形態において、「およそ」または「約」という用語は、別段の指示がない限りまたは文脈から明らかでない限り、記載された参照値のいずれかの方向（より大きい方向または小さい方向）の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下の範囲内に含まれる値の範囲を指す（当該数値が取り得る値の100%を超える場合を除く）。

10

【0041】

機能的等価物または誘導体：本明細書で使用される場合、「機能的等価物」または「機能的誘導体」という用語は、アミノ酸配列の機能的誘導体の文脈において、元の配列と実質的に類似の生物活性（機能または構造のいずれか）を保持する分子を意味する。機能的誘導体または等価物は、天然の誘導体であり得るか、または合成的に調製される。例示的な機能的誘導体は、タンパク質の生物活性が保存されている限り、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するアミノ酸配列を含む。置換アミノ酸は、望ましくは、置換されるアミノ酸と類似の化学的物理的性質を有する。望ましい類似の化学的物理的性質には、電荷、嵩高さ、疎水性、親水性などにおける類似性が含まれる。

20

【0042】

in vitro：本明細書で使用される場合、「*in vitro*」という用語は、多細胞生物内ではなく、人工的な環境、例えば、試験管内または反応容器内、細胞培養中などで生じる事象を指す。

【0043】

in vivo：本明細書で使用される場合、「*in vivo*」という用語は、ヒト及び非ヒト動物などの多細胞生物内で生じる事象を指す。セルベース系の文脈において、この用語は、生細胞内で（例えば、*in vitro*系とは対照的に）生じる事象を指すために使用され得る。

30

【0044】

IRES：本明細書で使用される場合、「IRES」という用語は、任意の好適な配列内リボソーム進入部位配列を指す。

【0045】

ポリペプチド：「ポリペプチド」という用語は、本明細書で使用される場合、ペプチド結合を介して一緒に連結されたアミノ酸の連続的な鎖を指す。本用語は、任意の長さのアミノ酸鎖を指すために使用されるが、当業者であれば、この用語が長い鎖に限定されるものではなく、ペプチド結合を介して一緒に連結された2つのアミノ酸を含む最小の鎖を指すこともできることを理解するであろう。当業者に知られているように、ポリペプチドは、プロセス及び/または修飾を受け得る。

40

【0046】

タンパク質：本明細書で使用される「タンパク質」という用語は、別個の単位として機能する1つ以上のポリペプチドを指す。単一のポリペプチドが別個の機能単位であり、別個の機能単位を形成するために他のポリペプチドとの永続的または一時的な物理的会合を必要としないならば、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、区別なく使用され得る。別個の機能的単位が物理的に互いに会合する1を超えるポリペプチドから構成されている場合、「タンパク質」という用語は、物理的に結合され、別個の単位として一緒に機能する複数のポリペプチドを指す。

50

【 0 0 4 7 】

調節エレメント：本明細書で使用される場合、「調節エレメント」という用語は、遺伝子の転写を調節及び/または制御することが可能な転写制御エレメント、特に、非コーディングシス作用転写制御エレメントを指す。調節エレメントは、少なくとも1つの転写因子結合部位、例えば、組織特異的転写因子に対する少なくとも1つの結合部位を含む。本明細書に記載される実施形態において、調節エレメントは、肝臓特異的転写因子に対する少なくとも1つの結合部位を有する。典型的に、調節エレメントは、プロモーター駆動型遺伝子発現を、調節エレメントを含まないプロモーター単独による遺伝子転写と比較して、増加または増強させる。したがって、調節エレメントは、特にエンハンサー配列を含むものであるが、転写を増強させる調節エレメントは、典型的にはるか上流にあるエンハンサー配列に限定されるものではなく、調節される遺伝子から任意の距離に存在し得ることを理解されたい。当該技術分野において理解されるように、転写を調節する配列は、*in vivo*で調節を受ける遺伝子の上流（例えば、プロモーター領域内）または下流（例えば、3'UTR内）のいずれかに位置し得、当該遺伝子のすぐ近くに位置してもよいし、かなり遠くに位置してもよい。調節エレメントは、天然に存在する配列、そのような調節エレメント（の一部）の組み合わせ、または調節エレメントのいくつかのコピー、例えば、天然に存在しない配列のいずれかを含み得る。したがって、調節エレメントには、天然に存在する配列と、所望の発現レベルを達成するように最適化または操作された調節エレメントとが含まれる。

10

【 0 0 4 8 】

対象：本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウタ、ヒツジ、ウマまたは霊長類）を指す。ヒトには、出生前及び出生後の形態が含まれる。多くの実施形態において、対象は、ヒトである。対象は、患者であり得、患者は、疾患の診断または治療のために医療提供者を訪れるヒトを指す。「対象」という用語は、本明細書において、「個体」または「患者」と区別なく使用され得る。対象は、疾患もしくは障害に罹患しているか、または疾患もしくは障害に罹患しやすい対象であり得るが、疾患または障害の症状を示す場合もあれば、示さない場合もある。

20

【 0 0 4 9 】

実質的に：本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、目的の特徴または性質が全体的または全体的に近い範囲または程度を示す定性的な条件を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的及び化学的現象は、たとえあったとしても、完了に至ること及び/または完了まで進行すること、あるいは絶対的な結果を達成することまたは回避することは稀であることを理解するであろう。したがって、「実質的に」という用語は、多くの生物学的及び/または化学的現象に本来備わる完全性の潜在的欠如を取り込むために、本明細書で使用される。

30

【 0 0 5 0 】

実質的な相同性：「実質的な相同性」という文言は、アミノ酸間または核酸配列間の比較を指すために本明細書で使用される。当業者であれば認識するように、2つの配列は、対応する位置に相同の残基を含有する場合、一般に、「実質的に相同」とであるとみなされる。相同の残基は、同一の残基であってもよい。あるいは、相同の残基は、同一でない残基であり得、適切に類似した構造的及び/または機能的特徴を有し得る。例えば、当業者にはよく知られているように、ある特定のアミノ酸は、典型的に、「疎水性」もしくは「親水性」アミノ酸として、及び/または「極性」もしくは「非極性」側鎖を有するものとして分類される。あるアミノ酸を同じタイプの別のアミノ酸に置換することは、多くの場合、「相同な」置換とみなされ得る。

40

【 0 0 5 1 】

当該技術分野においてよく知られているように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列にはBLASTN、ならびにアミノ酸配列にはBLASTP、*gapped BLAST*、及びPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラム中で利用可能な

50

ものを含む様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較され得る。例示的なそのようなプログラムは、Altschul, et al., basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及び Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999 に記載されている。上述のプログラムは、相同配列を同定することに加えて、典型的に、相同性の程度の表示を提供する。いくつかの実施形態において、2つの配列は、対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上が、残基の関連するストレッチにわたって相同である場合、実質的に相同であるとみなされる。いくつかの実施形態において、関連するストレッチは、完全配列である。いくつかの実施形態において、関連するストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500個またはそれ以上の残基である。

【0052】

実質的な同一性：「実質的な同一性」という文言は、アミノ酸間または核酸配列間の比較を指すために本明細書で使用される。当業者であれば認識するように、2つの配列は、対応する位置に同一の残基を含有する場合、一般に、「実質的に同一」であるとみなされる。当該技術分野においてよく知られているように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列にはBLASTN、ならびにアミノ酸配列にはBLASTP、gapped BLAST、及びPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラム中で利用可能なものを含む様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較され得る。例示的なそのようなプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及び Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999 に記載されている。上述のプログラムは、同一配列を同定することに加えて、典型的に、同一性の程度の表示を提供する。いくつかの実施形態において、2つの配列は、対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれ以上が、残基の関連するストレッチにわたって同一である場合、実質的に同一であるとみなされる。いくつかの実施形態において、関連するストレッチは、完全配列である。いくつかの実施形態において、関連するストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、40

10

20

30

40

50

0、425、450、475、500個またはそれ以上の残基である。

【0053】

罹患している：疾患、障害、及び/または状態に「罹患している」個体は、当該疾患、障害、及び/または状態であると診断されているか、あるいは、その1つ以上の症状を呈している。

【0054】

治療上有効な量：本明細書で使用される場合、治療薬の「治療上有効な量」という用語は、疾患、障害、及び/または状態に罹患しているまたは罹患しやすい対象に投与された場合、当該疾患、障害、及び/または状態を治療、診断、予防し、及び/またはその症状（複数可）の発症を遅延させるのに十分な量を意味する。当業者であれば、治療上有効な量は、典型的に、少なくとも1つの単位用量を含む投薬レジメンを介して投与されることを認識するであろう。

10

【0055】

治療すること：本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、または「治療すること」という用語は、特定の疾患、障害、及び/または状態の1つ以上の症状または特徴を、部分的にまたは完全に、緩和し、改善し、軽減し、抑制し、予防し、それらの発生を遅延させ、それらの重症度を低下させ、及び/またはそれらの発生率を低下させるために使用される任意の方法を指す。治療は、疾患に関連する病理所見を呈するリスクを低減させる目的で、当該疾患の徴候を示していない対象及び/または当該疾患の初期徴候のみを示す対象に施されてもよい。

20

【0056】

本明細書において、端点による数値範囲の記載は、当該範囲内に包含される全ての数値及び小数を含む（例えば、1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.9、4及び5を含む）。また、全ての数値及びその小数は、「約」という用語によって修飾されているものとみなされることも理解されたい。

【0057】

本発明の様々な態様が以下のセクションにおいて詳細に記載される。セクションの使用は、本発明を限定することを意味するものではない。各セクションは、本発明のいかなる態様にも適用することができる。本願において、「または」の使用は、別段の指示がない限り、「及び/または」を意味する。本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈により別途明示される場合を除き、単数と複数の両方の指示対象を含む。

30

【0058】

本発明の様々な態様が以下のセクションにおいて詳細に記載される。セクションの使用は、本発明を限定することを意味するものではない。各セクションは、本発明のいかなる態様にも適用することができる。本願において、「または」の使用は、別段の指示がない限り、「及び/または」を意味する。

【0059】

詳細な説明

本開示は、HAEなどのC1-INH欠損に関連する疾患を治療するためにC1-INHの*in vivo*産生をもたらす効率的かつ口バスタな組み換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターについて記載する。

40

【0060】

遺伝性血管浮腫（HAE）

HAEは、C1-INHのレベル低下と、それに伴うブラジキニンの上方制御を特徴とする。HAEは、常染色体優性の遺伝形式であり、10,000人に1人から50,000人に1人の割合で発症する。HAE（I型及びII型）の根本的な原因は、11番染色体に位置するC1エステラーゼインヒビター遺伝子（C1EI遺伝子またはSERPING1遺伝子）における変異の常染色体優性遺伝だと考えられる。SERPING1遺伝子の常染色体優性変異は、300を超えるものであり得るが、遺伝子治療が可能である。H

50

AE症例の85%は、C1エステラーゼインヒビターの産生量が不足するI型である(例えば、Gower et al., World Allergy Organ J., 4: S9-S21(2011); Cungo et al., Trends Mol Med, 15: 69-78(2009); Gooptu et al., Annu Rev Biochem, 78: 147-176(2009); 及びZuraw et al., J Allergy Clin Immunol Pract, 1: 458-467(2013)参照)。残りの症例は、機能不全のC1エステラーゼインヒビターの発現を特徴とする。

【0061】

HAEに関連する発作の頻度、期間及び重症度は様々であり、患者の30%が1ヶ月に1回を超える発作頻度を報告し、40%が1年に6~11回の発作を報告し、残りの30%は稀にしか症状を示さない。通常、症状は、12~36時間かけて一過性に進行し、2~5日以内で治まるが、一部の発作は、1週間ほど継続する場合もある。HAEのエピソードは自己限定性であるが、予測できない発作の発生は、患者にとって大きな負担であり、多くの場合、生活の質に大きな影響を与え、命にかかわることもある。

10

【0062】

現在まで、長期予防、急性発作の治療及び短期予防(すなわち、歯科手術前)に対して、治療薬が適応されており、これらには、有害作用プロファイルの高いダナゾール、C1インヒビター補充タンパク質、ブラジキニン受容体アンタゴニスト、カリクレインインヒビター、新鮮凍結血漿及び精製C1インヒビターなどの薬剤が含まれる。これらの治療法は、症状を緩和し、生活の質を最大限に高めることができるが、疾患の再発及び長期間の継続投与の必要性は、依然として治療の大きな障害となっている(例えば、Aberer, Ann Med, 44: 523-529(2012); Charignon et al., Expert Opin Pharmacother, 13: 2233-2247(2012); Papadopoulou-Alataki, Curr Opin Allergy Clin Immunol, 10: 20-25(2010); Parikh et al., Curr Allergy Asthma Rep, 11: 300-308(2011); Tourangeau et al., Curr Allergy Asthma Rep, 11: 345-351(2011); Bowen et al., Ann Allergy Asthma Immunol, 100: S30-S40(2008); Frank, Immunol Allergy Clin North Am, 26: 653-668(2006); Cicardi et al., J Allergy Clin Immunol, 99: 194-196(1997); Kreuz et al., Transfusion 49: 1987-1995(2009); Bork et al., Ann Allergy Asthma Immunol, 100: 153-161(2008); 及びCicardi et al., J Allergy Clin Immunol, 87: 768-773(1991)参照)。

20

30

【0063】

本発明は、とりわけ、hC1-INHをコードするコドン最適化SERPING1配列を含む組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを使用して、HAEを治療するための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、ヒトC1-INHをコードするコドン最適化配列SERPING1を含むrAAVを、HAEの少なくとも1つの症状または特徴が強度、重症度、または頻度において減少するような有効量で投与することによって、HAEを治療する方法を提供する。本明細書に記載される遺伝子治療法は、治療レベルのhC1-INHを発現させるのに特に有効であった。

40

【0064】

rAAV SERPING1ベクター設計

いくつかの態様において、本明細書で提供されるのは、C1-INHをコードする組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターである。rAAVベクターは、カプシド及びSERPING1配列を含む。

【0065】

50

本開示の例示的な r A A Vベクターを例示する模式図は、図 1 A 及び図 1 B に示される。図 1 A に示されるように、いくつかの実施形態において、本開示の r A A Vベクターは、肝臓特異的プロモーター、5' 及び 3' 末端逆位反復 (I T R)、シス作用調節モジュール (C R M)、ならびにイントロンを含む。

【 0 0 6 6 】

ベクターの S E R P I N G 1 配列は、野生型またはコドン最適化バリエーションであり得る。したがって、いくつかの実施形態において、r A A Vベクターは、野生型 S E R P I N G 1ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、r A A Vベクターは、コドン最適化 S E R P I N G 1 配列を含む。

【 0 0 6 7 】

本発明の好適な C 1 - I N H は、天然に存在する C 1 - I N H の少なくとも一部の活性を代替するか、または C 1 - I N H 欠損に関連する 1 つ以上の表現型もしくは症状を解放することができる、任意のタンパク質またはタンパク質の一部である。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態において、本発明に好適な C 1 - I N Hヌクレオチド配列は、ヒト C 1 - I N Hタンパク質をコードする S E R P I N G 1 配列を含む。天然に存在するヒト C 1 - I N Hヌクレオチド配列は、GenBank : A F 4 3 5 9 2 1 . 1 に示されている。対応するヒト C 1 - I N Hアミノ酸配列を表 1 に示す。

【 表 1 】

表 1. ヒト C 1 - I N H配列

<p>ヒト C 1 - I N H (アミノ酸配列) (GenBank : A A M 2 1 5 1 5 . 1)</p> <p>MASRLTLLTLLLLLAGDRASSNPATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPILE VSSLPTTNSTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFCPG PVTLCSDLESHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGA GENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTLYSSS PRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNKNISRLDLSLPSDTRLVLLNAIYLSAKWKTTFDPKK TRMEPFHFKNVSVIKVPMMNNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGLQLSHNLSLVILVPQNLKHRL EDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTLPRIKVTTSDMLSIMKLEFFDFSYDLNLC GLTEDPDLQVSAMQHQTVLELTETGVEAAAASAI SVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHK FPVFMGRVYDPRA</p> <p>(配列番号 1)</p>
--

様々な種類のプロモーターを本明細書に記載される r A A Vベクターに使用することができる。これらには、例えば、ユビキタスプロモーター、組織特異的プロモーター、及び制御性 (例えば、誘導性または抑制性) プロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態において、プロモーターは、肝臓特異的プロモーターである。肝臓特異的プロモーターの例は、当該技術分野において知られており、例えば、ヒトトランスサイレチンプロモーター (T T R)、改変 h T T R、(h T T R m o d .)、 α -抗トリプシンプロモーター、ヒト第 I X 因子 p r o / 肝臓転写因子応答性オリゴマー、L S P、C M V / C B A プロモーター (1 . 1 k b)、C A G プロモーター (1 . 7 k b)、m T T R、改変 m T T R、

mTTR pro、mTTRエンハンサー、及び基本的なアルブミンプロモーターが挙げられる。肝臓特異的プロモーターは、例えば、Zhi j i a n W u e t a l . , M o l e c u l a r T h e r a p y v o l . 1 6 , n o 2 , F e b r u a r y 2 0 0 8 に記載されており、その内容は、参照により本明細書に援用される。

【0069】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、ユビキタスプロモーターである。いくつかの実施形態において、プロモーターは、ニワトリベータアクチンプロモーターである。

【0070】

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、mRNAの転写及び/または翻訳を促進する追加のエンハンサーまたは調節エレメント（例えば、エンハンサー配列、コザック配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列、IRESなど）を含有する。いくつかの実施形態において、ベクターは、5'及び3'末端逆位反復（ITR）を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、1つ以上のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、polyAテールを含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、イントロンなどの1つ以上の小さなエレメントを含む。様々なイントロンが当該技術分野において知られている。本明細書に記載されるrAAVベクターに好適なイントロンとしては、例えば、MVMイントロン、切断型F・IXイントロン、キメラ グロビンSD/免疫グロブリン重鎖SAイントロン、SV40及び/またはアルファグロビン第1イントロンが挙げられる。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、MVMイントロンを含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、SV40イントロンを含む。いくつかの実施形態において、イントロンは、SERPING1遺伝子のエクソン1 - イントロン1 - 部分的エクソン2であり得る。

【0072】

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含み、これは、WPREが、多数の組織においてウイルスベクターの導入遺伝子発現を増加させるからである。WPREについては、様々な最適化またはバリエーション形態が当該技術分野において知られており、例えば、なかでも、WPRE野生型、WPRE3、及びWPREmut6delATGが挙げられる。WPRE及び関連するWPREバリエーションは、米国特許第10,179,918号；米国特許第7,419,829号；米国特許第9,731,033号；米国特許第8,748,169号；米国特許第7,816,131号；米国特許第8,865,881号；米国特許第6,287,814号；米国特許出願公開第2016/0199412号；米国特許出願公開第2017/0114363号；米国特許出願公開第2017/0360961号；米国特許出願公開第2019/0032078号；米国特許出願公開第2018/0353621号；国際公開第WO2017201527号；国際公開第WO2018152451号；国際公開第WO2013153361号；国際公開第WO2014144756号；欧州特許第EP1017785号；及び欧州特許出願公開第3440191号に記載されている。前述の公開物のそれぞれは、その全体を参照により本明細書に援用される。

【0073】

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、1つ以上のシス調節エレメント（CRE）を含む。CREは、コンストラクトの骨格エレメントを改変したものである。CREについては、様々な最適化またはバリエーション形態が当該技術分野において知られており、例えば、なかでも、CRE4及びCRE6が挙げられる。次の公開物はCREの様々なバリエーションについて記載しており、そのそれぞれは参照により本明細書に援用される：国際公開第WO2016146757号、同第WO2014064277号、同第WO2014063753号、及び同第WO2009130208号。

【0074】

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、シス作用調節モジュール（CRM

)を含む。様々な種類のCRMが本明細書に記載されるベクターの使用に好適であり、例えば、肝臓特異的CRM、ニューロン特異的CRM及び/またはCRM8が挙げられる。いくつかの実施形態において、ベクターは、1つを超えるCRMを含む。例えば、いくつかの実施形態において、ベクターは、2、3、4、5または6つのCRMを含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、3つのCRM、例えば、3つのCRM8を含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、転写物の安定性を高め、より効率的に翻訳し、免疫原性を低下させるように配列が最適化されている。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、転写物の安定性を高め、より効率的に翻訳し、及び/または免疫原性を低下させるように配列が最適化されている。いくつかの実施形態において、SERPING1は、配列が最適化されている。

10

【0076】

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、またはAAV11ベクターである。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV1である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV2である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV3である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV4である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV5である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV6である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV7である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV8である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV9である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV10である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、AAV11である。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、配列が最適化されている。いくつかの実施形態において、rAAVカプシドは、改変されている。

20

【0077】

例示的なエレメント配列は、以下の表2に示される。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、表2に示されるベクターエレメント配列と、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、rAAVベクターエレメントを含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、表2に示されるベクターエレメントヌクレオチド配列と同一のベクターエレメントヌクレオチド配列を含む。

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : ベクターのHAEコンストラクト (発現カセット) に含有される配列

SERPING1 野生型配列(GC 含量 53%、24 の CpG)	
(NCBI 参照配列:NM_000062.2)	
ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTGGGGATAGAG	
CCTCCTCAAATCCAAATGCTACCAGCTCCAGCTCCCAGGATCCAGAGAGTTTGCAAGA	
CAGAGGCGAAGGGAAGGTCGCAACAACAGTTATCTCCAAGATGCTATTCGTTGAACC	
CATCCTGGAGGTTTCCAGCTTGCCGACAACCAACTCAACAACCAATTCAGCCACCAA	10
AATAACAGCTAATACCACTGATGAACCCACCACACAACCCACCACAGAGCCCACCAC	
CCAACCCACCATCCAACCCACCCAACCAACTACCCAGCTCCCAACAGATTCTCCTACC	
CAGCCCCTACTGGGTCTTCTGCCAGGACCTGTTACTCTCTGCTCTGACTTGGAGA	
GTCATTCAACAGAGGCCGTGTTGGGGGATGCTTTGGTAGATTTCTCCCTGAAGCTCTA	
CCACGCCTTCTCAGCAATGAAGAAGGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCCCATTCAGC	
ATCGCCAGCCTCCTTACCCAGGTCCTGCTCGGGGCTGGGGAGAACACCAAAAACAAAC	
CTGGAGAGCATCCTCTCTTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCACCAGGCCCTGAAGG	
GCTTCACGACCAAAGGTGTCACCTCAGTCTCTCAGATCTTCCACAGCCCAGACCTGGC	20
CATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTCGGACCCTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGT	
CCTAAGCAACAACAGTGACGCCAACTTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAA	
CACCAACAACAAGATCAGCCGGCTGCTAGACAGTCTGCCCTCCGATACCCGCCTTGTC	
CTCCTCAATGCTATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACAACATTTGATCCCAAGAAA	
ACCAGAATGGAACCCTTTCCTTCAAAAACCTCAGTTATAAAAAGTGCCCATGATGAAT	
AGCAAGAAGTACCCTGTGGCCCATTTCAATTGACCAAACCTTTGAAAGCCAAGGTGGGG	
CAGCTGCAGCTCTCCACAATCTGAGTTTGGTGATCCTGGTACCCAGAACCTGAAAC	
ATCGTCTTGAAGACATGGAACAGGCTCTCAGCCCTTCTGTTTTCAAGGCCATCATGGA	
GAAACTGGAGATGTCCAAGTTCCAGCCCCTCTCCTAACACTACCCGCATCAAAGTG	30
ACGACCAGCCAGGATATGCTCTCAATCATGGAGAAATTGGAATTCCTCGATTTTTCTT	
ATGACCTTAACCTGTGTGGGCTGACAGAGGACCCAGATCTTCAGGTTTCTGCGATGCA	
GCACCAGACAGTGCTGGAAGTACAGAGACTGGGGTGGAGGCGGCTGCAGCCTCCGC	
CATCTCTGTGGCCCGCACCCCTGCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTCGTGC	
TCTGGGACCAGCAGCACAAGTTCCTGTCTTCATGGGGCGAGTATATGACCCAGGG	
CCTGA	
(配列番号 2)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

コドン最適化 SERPING1 配列	
HA03	
ATGGCCAGCAGGCTGACCCTGCTGACCCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCTGGAGACAGGG	
CCAGCAGCAACCCCAATGCCACCAGCAGCAGCAGCCAGGACCCTGAGAGCCTGCAGG	
ACAGGGGAGAGGGCAAGGTGGCTACCACAGTGATCAGCAAGATGCTGTTTGTGGAGCC	
CATCCTGGAGGTGAGCAGCCTGCCACCACCAACAGCACCACCAACAGTGCCACCAAG	
ATCACAGCCAACACCACAGATGAGCCCACCACCAGCCCACCACAGAGCCCACCACCC	10
AGCCCACCATCCAGCCCACCAGCCCACCACCAGCTGCCACAGACAGCCCCACCCA	
GCCCACCACAGGCAGCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACCCTGTGCAGTGACCTGGAGAGCC	
ACAGCACAGAGGCTGTGCTGGGAGATGCCCTGGTGGACTTCAGCCTGAAGCTGTACCA	
TGCCTTCAGTGCCATGAAGAAGGTGGAGACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTCAGCATTG	
CCAGCCTGCTGACCAGGTGCTGCTGGGAGCTGGAGAGAACACCAAGACCAACCTGGA	
GAGCATCCTGAGCTACCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAGGCCCTGAAGGGCTTC	
ACCACCAAGGGAGTGACCAGTGTGAGCCAGATCTTCCACAGCCCTGACCTGGCCATCA	
GGGACACCTTTGTGAATGCCAGCAGGACCCTGTACAGCAGCAGCCCCAGGGTGCTGAG	20
CAACAACAGTGATGCCAACCTGGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAAC	
AACAAGATCAGCAGGCTGCTGGACAGCCTGCCAGTGACACCAGGCTGGTGTGCTGTA	
ATGCCATCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACCACCTTTGACCCCAAGAAGACCAGGAT	
GGAGCCCTTCCACTTCAAGAACAGTGTGATCAAGGTGCCCATGATGAACAGCAAGAAG	
TACCCTGTGGCCCACTTCATTGACCAGACCCTGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTTCAGCT	
TAGCCACAACCTGAGCCTGGTGTATCCTGGTGGCCCCAGAACCTGAAGCACAGGCTGGAG	
GACATGGAGCAGGCCCTGAGCCCCAGTGTGTTCAAGGCCATCATGGAGAAGCTGGAGA	
TGAGCAAGTTCCAGCCCACCCTGCTGACCCTGCCAGGATCAAGGTGACCACCAGCCA	
GGACATGCTGAGCATCATGGAGAAGCTGGAGTTCTTTGACTTCAGCTATGACCTGAACC	30
TGTGTGGCCTGACAGAGGACCCTGACCTGCAAGTCAGTGCCATGCAGCACCAGACAGT	
GCTGGAGCTGACAGAGACAGGAGTGGAGGCTGCTGCTGCCAGTGCCATCAGTGTGGCC	
AGGACCCTGCTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCTGTTTGTGCTGTGGGACCAGCA	
GCACAAGTTCCTGTGTTTCATGGGCAGGGTGTATGACCCCAGGGCCTAG	
(配列番号 4)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

コドン最適化 SERPING1 配列	
HA05	
<p>ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTGGGGACAGAGC CTCCTCAAATCCAAATGCTACCAGCTCCAGCTCCCAGGACCCAGAGAGCCTCCAAGAC AGAGGAGAAGGCAAGGTGGCAACAACAGTCATCTCCAAGATGCTCTTTGTGGAACCCA TCCTGGAGGTCTCCAGCCTCCCTACAACCAACTCAACAACCAATTCAGCCACCAAGATA ACAGCTAATACCACTGATGAACCCACCACACAACCCACCACAGAGCCCACCACCCAAC CCACCATCCAACCCACCCAACCAACTACCCAGCTCCAACAGACTCTCCTACCCAGCCC ACTACTGGCTCCTTCTGCCCAGGACCTGTCACTCTCTGCTCTGACCTGGAGAGCCACTC AACAGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTCTGGTGGACTTCTCCCTGAAGCTCTACCATGCCT TCTCAGCAATGAAGAAAGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCCCCATTTCAGCATTGCCAGC CTCCTGACCCAGGTCTGCTGGGGGCTGGAGAGAACACCAAGACAAACCTGGAGAGCA TCCTCTTTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCATCAGGCCCTGAAGGGCTTCACTACC AAGGGTGTACCTCAGTCTCTCAGATCTTCCACAGCCCAGACCTGGCCATAAGGGACA CCTTTGTGAATGCCTCTAGGACCCTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTCAGCAACAAC AGTGATGCCAACCTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAACAACAAGA TCAGCAGGCTGCTGGACAGCCTGCCCTCTGACACCAGGCTGGTCCTCCTCAATGCTATC TACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACAACATTTGATCCCAAGAAAACCAGAATGGAACCCT TTCACCTCAAGAACTCAGTCATAAAGGTGCCCATGATGAATAGCAAGAAATACCCTGT GGCCCACTTCATTGACCAAACCTCTCAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCAC AATCTGAGCCTGGTGATCCTGGTGCCCAAGCCTGAAGCACAGACTGGAAGACATGG AACAGGCTCTCAGCCCTTCTGTCTTCAAGGCCATCATGGAGAAGCTGGAGATGTCCAA GTTCCAGCCCCTCTCCTCACACTCCCCAGGATCAAGGTCCTACCAGCCAGGACATGC TCTCAATCATGGAGAAGCTGGAATTCTTTGACTTTTCTTATGACCTGAACCTGTGTGGC CTGACAGAGGACCCAGATCTCCAGGTCTCTGCTATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAAC TGACAGAGACTGGAGTGGAGGCTGCTGCAGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGGACCCT GCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTTGTGCTCTGGGACCAGCAGCACAAGT TCCCTGTCTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCCAGGGCCTAG</p>	<p>10 20 30</p>
(配列番号 6)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

コドン最適化 SERPING1 配列	
HA06	
ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTGGGGACAGGGC	
CTCCTCAAACCCCAATGCCACCAGCTCCAGCTCCCAGGACCCAGAGAGCCTCCAGGAC	
AGGGGGGAAGGCAAGGTGGCTACCACAGTCATCTCCAAGATGCTCTTTGTGGAGCCCA	
TCCTGGAGGTCTCCAGCCTCCCCACCACCAACTCAACCACCAACTCAGCCACCAAGATC	
ACAGCCAACACCACTGATGAGCCCACCACACAGCCCACCACAGAGCCCACCACCAGC	10
CCACCATCCAGCCCACCAGCCCACCACCAGCTCCCCACAGACTCCCCACCAGCCC	
ACCACTGGCTCCTTCTGCCCAGGCCCTGTCACCCTCTGCTCTGACCTGGAGAGCCACTC	
AACAGAGGCTGTGCTGGGGGATGCCCTGGTGGACTTCTCCCTGAAGCTCTACCATGCCT	
TCTCAGCCATGAAGAAGGTGGAGACCAACATGGCCTTCTCCCCCTTCAGCATTGCCAGC	
CTCCTGACCCAGGTCTGCTGGGGGCTGGGGGAGAACACCAAGACCAACCTGGAGAGCA	
TCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCATCAGGCCCTGAAGGGCTTCACCACC	
AAGGGAGTCACCTCAGTCTCCAGATCTTCCACAGCCCAGACCTGGCCATCAGGGACA	
CCTTTGTGAATGCCTCCAGGACCCTGTACAGCAGCAGCCCCAGGGTCTCAGCAACAA	20
CAGTGATGCCAACCTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAACAACAAG	
ATCAGCAGGCTGCTGGACAGCCTGCCCTCTGACACCAGGCTGGTCTCCTCAATGCCAT	
CTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACCACCTTTGATCCCAAGAAGACCAGGATGGAACCC	
TTCCACTTCAAGAACTCAGTCATCAAGGTGCCCATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTG	
TGGCCCACTTCATTGACCAGACCCTCAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCAC	
AACCTGAGCCTGGTGATCCTGGTGCCCCAGAACCTGAAGCACAGGCTGGAGGACATGG	
AACAGGCCCTCAGCCCCTCTGTCTTCAAGGCCATCATGGAGAAGCTGGAGATGTCCAA	
GTTCCAGCCCACCCTCCTCACCCCTCCCCAGGATCAAGGTGACCACCAGCCAGGACATGC	
TCTCAATCATGGAGAAGCTGGAGTTCTTTGACTTCTCCTATGACCTGAACCTGTGTGGC	30
CTGACAGAGGACCCAGATCTCCAGGTCTCTGCCATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAAC	
TGACAGAGACTGGAGTGGAGGCTGCTGCAGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGGACCCT	
GCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGCCCTTCTCTTTGTGCTCTGGGACCAGCAGCACAAGT	
TCCCTGTCTTCATGGGCAGGGTGTATGACCCCAGGGCCTAG	
(配列番号 7)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA11	
<p>ATGGCATCAAGGCTGACCCTTCTCACCCCTGCTCCTGCTGCTTCTGGCTGGGGACAGAGC CTCCAGCAACCCCAATGCCACCTCCAGCAGCTCTCAAGATCCAGAGTCCCTGCAAGAC CGGGGAGAAGGCAAGGTGGCTACCACAGTCATCTCCAAGATGCTCTTTGTGGAACCCA TCCTGGAAGTGTCCCTCCCTCCCCACCACTAACTCCACCACAAACTCTGCCACTAAGATC ACAGCCAACACTACAGATGAGCCAACCTACCCAGCCTACAACAGAGCCTACCACCCAAC CAACCATCCAGCCAACCCAGCCCACCACTCAGCTGCCACAGACAGCCCAACACAGCC CACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACCCTCTGCAGTGACTTGGAAGCCACA GCACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTCTGGTGGACTTTTCTCTCAAGCTGTACCATGCT TTCTCAGCAATGAAGAAAGTAGAGACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTTTCCATTGCCAG CCTCCTCACTCAAGTGCTCCTGGGGGCTGGAGAGAATAACAAAACCAACCTGGAGAGC ATCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCCCTGAAAGGCTTCACAAC CAAGGGGGTGACTTCTGTCTCCCAGATCTTCCACTCTCCAGACCTGGCCATCAGAGACA CCTTCGTGAATGCAAGTAGGACCCTCTACAGCTCCTCCCCAAGGGTGCTGTCCAACAAT TCTGATGCCAATCTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACAAACAACAAGA TTTCTAGGCTCCTGGACTCCCTGCCTTCTGACACAAGACTGGTTCTGCTGAATGCTATCT ACCTGTCTGCAAAGTGGAAGACCACCTTTGACCCCAAAAAGACAAGGATGGAGCCCTT CCATTTTAAGAATTCAGTGATCAAGGTGCCCATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTT GCCCACTTCATTGACCAAACACTGAAGGCCAAAGTGGGCCAGCTCCAGCTTTCCACA ACCTCAGCCTGGTGATTCTGGTCCCCCAGAACTTGAAGCACCGGCTGGAGGACATGGA GCAAGCACTGAGCCCCAGTGTCTTCAAGGCAATCATGGAAAACTGGAGATGTCCAAA TTCCAGCCCCTCTGTTGACCTTGCCCAGAATCAAAGTCACCACCAGCCAAGATATGCT GAGTATCATGGAGAAGCTTGAGTTCTTTGATTTCTCCTATGATCTGAACCTGTGTGGCC TGACAGAAGACCCTGACCTCCAAGTCAGTGCCATGCAGCACCCAGACAGTGTTGGAGCT GACTGAGACTGGTGTGGAGGCAGCAGCCGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGAACCCTG CTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCTTTCCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAACACAAGTT CCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCAAGGGCCTGA</p>	<p>10 20 30</p>
(配列番号 8)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA12	
ATGGCAAGCAGACTGACCTTGCTGACACTGCTCCTTCTCCTGCTGGCTGGAGACCGGGC	
CAGCAGCAACCCCAATGCCACTTCTTCTCCAGTCAAGACCCAGAGTCCCTGCAAGAC	
AGAGGAGAAGGCAAGGTTGCTACCACTGTGATCTCCAAGATGCTGTTTCGTGGAGCCCA	
TCCTGGAAGTGTCCAGCCTGCCACCACTAACTCCACCACAAACAGTGCCACCAAAAT	
CACAGCCAACACTACAGATGAGCCAACCACCCAACCAACCACAGAACCCACAACACA	10
GCCTACCATCCAGCCTACTCAGCCCACCACCCAGCTTCCCTACAGACTCCCCACCCAGC	
CAACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACTCTGTGCTCTGACCTGGAGAGCCAC	
AGCACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTCTGGTGGACTTCTCCCTGAAACTGTACCACGC	
CTTTTCAGCCATGAAGAAAGTAGAGACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTTAGCATTGCCT	
CCCTCCTCACTCAAGTTCTGCTGGGGGCTGGGGGAGAACAACAAGACCAACCTGGAAAG	
CATCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCACTCAAGGGCTTCACAA	
CCAAGGGGGTGACCAGTGTCTCCAGATCTTCCATTCCCAGACCTGGCCATCAGAGAC	
ACATTTGTGAATGCATCCAGAACCCTCTACAGCTCCTCTCCAAGGGTGCTGTCCAACAA	20
CTCAGATGCCAATCTTGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAAATAACCAATAACAAG	
ATCTCAAGGCTGCTGGACAGCCTCCCCAGTGACACCAGACTTGTGCTCCTGAATGCTAT	
CTACCTGTCTGCAAAGTGGAAGACTACCTTTGATCCCAAAAAGACAAGGATGGAGCCT	
TTCCACTTCAAGAACTCTGTCATCAAAGTGCCCATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGT	
TGCCCACTTTATTGATCAGACCCTGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCACA	
ACCTTTCTCTGGTGATTCTGGTCCCCCAGAACCCTGAAGCACAGATTGGAAGACATGGAG	
CAAGCCCTGAGCCCTTCAGTGTTTAAGGCAATCATGGAGAAGCTGGAGATGTCCAAAT	
TCCAGCCCCTCTCCTCACCTGCCTAGGATCAAGGTCACCACCAGCCAAGATATGCTC	
TCTATCATGGAAAAGTTGGAGTTCTTTGACTTTTCTATGATCTGAACCTCTGTGGCCTG	30
ACTGAGGACCCTGACCTCCAAGTGTGAGCAATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAGCTCA	
CAGAGACTGGGGTGGAAGCCGCAGCAGCCTCTGCCATCTCTGTGGCTAGGACCCTTCT	
GGTCTTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAACACAAGTTCC	
CAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCAGAGCCTGA	
(配列番号 9)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA14	
<p>ATGGCCAGCAGACTCACCCCTCCTCACTCTGCTCCTGCTTCTGCTGGCTGGGGACCGGG CCTCTAGCAACCCCAATGCCACCAGCTCCTCCAGCCAAGATCCAGAATCTCTGCAAGA CAGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACTACTGTGATCAGCAAGATGCTCTTTGTGGAGCC CATCCTGGAAGTGAGCAGCCTCCCCACTACCAACAGCACCCTAACTCAGCTACCAA GATCACAGCCAATACCACAGATGAACCCACCACACAGCCTACAACAGAACCTACCAC TCAACCCACCATCCAGCCTACTCAGCCCACCACCCAGCTGCCACAGACTCCCCAACC CAGCCAACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTCACACTCTGCAGTGACTTGGAGA GCCACAGCACTGAGGCTGTGCTGGGAGATGCCCTGGTGGACTTTTCCCTCAAGCTCTA CCACGCCTTCTCAGCAATGAAGAAAGTAGAGACCAACATGGCATTCTCTCCTTTCAGC ATTGCCTCCCTGCTGACCCAAGTCCTCCTGGGGGCTGGAGAGAACACTAAAACCAAT CTTGAGTCCATCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTCCACCAAGCACTGAAAG GCTTCACAACCAAAGGAGTGACCTCTGTGTCCCAGATCTTCCATTCCCCTGATCTGGC CATCAGAGACACCTTCGTGAATGCTTCCAGAACCTTGTACAGCTCTAGCCCAAGGGTG CTGTCCAACAATTCTGATGCTAATCTGGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAAAAC ACAAACAACAAGATTTCTAGGCTCCTGGACAGCCTGCCTTCTGACACAAGGCTGGTTC TGCTGAATGCAATCTACCTGTCTGCAAAGTGGAAGACCACCTTTGACCCCAAAAAGA CAAGGATGGAGCCATTCCACTTCAAGAACAGTGTATCAAAGTGCCCATGATGAACT CCAAGAAGTACCCAGTGGCCCATTTTCATTGATCAGACCCTGAAGGCCAAGGTGGGCC AGCTCCAGCTTTCCACAACCTCTCACTGGTGATTCTGGTCCCCCAGAACCTGAAGCA CCGGCTGGAAGATATGGAGCAAGCCCTCAGCCCAGTGTGTTTAAGGCTATCATGGA GAAGCTGGAGATGTCCAAATTCCAGCCCCTCTCCTGACACTGCCAAGGATCAAGGT CACCACCTCCCAAGACATGCTGTCAATCATGGAAAACTGGAGTTCTTTGATTTCTCC TATGACCTGAACCTGTGTGGCCTGACTGAGGACCCTGACCTCCAAGTGTCTGCCATGC AGCACCAGACAGTGCTGGAGCTCACAGAGACTGGGGTGGAAGCCGCTGCTGCCTCAG CCATCTCAGTGGCTAGGACCCTGCTGGTCTTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCTGTTTGT CCTGTGGGACCAGCAACACAAGTTCCCTGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGATCCCAG AGCCTGA</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
(配列番号 11)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA15	
<p>ATGGCATCTAGGCTGACACTGCTCACCTTGCTCCTGCTGCTTCTGGCTGGGGACAGAGC TTCCTCCAACCCCAACGCCACCTCCAGCTCTTCCCAAGACCCTGAGTCTCTGCAAGATA GGGGGGAGGGCAAGGTGGCTACCACAGTCATCAGCAAGATGCTCTTTGTGGAACCCAT CCTGGAAGTGAGCAGCCTCCCCACTACCAATAGCACCACCAACAGTGCCACAAAGATC ACAGCCAACACTACAGATGAGCCAACCACTCAGCCCACAACAGAGCCTACTACCCAGC CCACCATCCAGCCCACACAGCCTACCACCCAGCTTCCTACAGACAGCCCCACTCAACCC ACCACTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTGACCCTCTGCAGTGACTTGGAGAGCCACAG CACTGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTCTGGTGGACTTTTCCCTCAAGCTCTACCACGCCT TCTCTGCAATGAAGAAGGTTGAGACCAACATGGCCTTTAGCCCATTCAGCATTGCCTCC TTGCTGACCCAAGTCCTGCTGGGGGCTGGAGAGAACACCAAAAACAAATCTTGAGTCCA TCCTCTCCTACCCCAAAGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCACTGAAAGGCTTCACAACC AAGGGGGTGACTTCTGTGTCCCAGATCTTCCACTCTCCTGACCTGGCCATCAGAGACAC CTTTGTCAATGCCAGCAGAACCCTTTACAGCTCCTCCCAAGAGTCCTCAGCAACAATT CTGATGCCAATCTGGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCAAAAAACACAAACAACAAGAT TTCCAGACTCCTGGACTCCCTGCCTTCTGACACAAGGCTGGTTCTGCTGAATGCTATCT ACCTGTCTGCCAAGTGGAAGACCACATTTGACCCCAAGAAAACCAGAATGGAGCCCTT CCATTTCAAGAACTCAGTGATCAAGGTCCCCATGATGAACAGCAAAAAGTACCCTGTT GCCCCTTCATTGATCAGACCCTGAAGGCCAAAGTGGGCCAGCTCCAGCTGTCCCACA ACCTGAGCCTGGTCATTCTGGTGTCCCAAGAACCTGAAGCACAGACTGGAAGATATGGA GCAAGCCCTGAGCCCTTCAAGTCTTTAAGGCAATCATGGAGAAGCTGGAGATGTCCAAG TTCCAGCCAACCTCTCCTCACTCTGCCAGAATCAAAGTCACCACCAGCCAAGACATGCT GAGTATCATGGAAAACTGGAGTTCTTTGATTTCTCCTATGACCTGAACCTCTGTGGCC TGACTGAGGACCCAGACCTCCAAGTGTCTGCCATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAGCT CACAGAACTGGTGTGGAGGCCGCTGCTGCCTCAGCCATCAGTGTGGCCCGCACCCCTG TTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCTTTCCTGTTTCGTGCTGTGGGACCAGCAACACAAGTT TCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGATCCAAGGGCCTGA</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
(配列番号 12)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA16	
<p>ATGGCCTCTAGGCTCACCCCTGCTGACACTGCTGCTCCTCCTGCTGGCTGGAGACCGGGC CAGCAGCAACCCCAATGCTACCAGCTCCTCCAGTCAAGACCCTGAGTCCCTGCAAGAC AGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACTACAGTCATCTCCAAGATGCTGTTTGTAGAGCCCA TCCTGGAAGTGTCCAGCCTGCCTACCACCAATAGCACCACCAACAGTGCCACCAAGAT CACAGCCAATACCACAGATGAGCCAACCACCCAGCCTACAACAGAGCCTACCACTCAA CCCACCATCCAGCCAACACAGCCTACTACCCAGCTGCCACAGACAGCCCAACTCAGC CCACCACTGGCTCCTTCTGCCCTGGCCCTGTCACACTCTGCAGTGACCTGGAAAGCCAC AGCACTGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTCTGGTGGACTTTTCTCTGAAACTGTACCACGC CTTCTCTGCAATGAAGAAAGTGGAGACCAACATGGCATTCTCCCCATTGAGCATTGCCT CCTTGCTGACCCAAGTGCTCCTGGGGGCTGGGGGAGAACAACAAAAACAACCTGGAGAG CATCCTCTCCTACCCCAAGGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCCCTCAAGGGCTTCACAA CCAAAGGAGTGACCTCTGTGAGCCAGATCTTCCATTCCCCTGACCTGGCCATTAGGGAC ACCTTCGTGAATGCAAGCCGGACCCTCTACAGCAGCTCTCCAAGAGTCCTGTCCAACAA TTCTGATGCCAACCTAGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCAAAGAACAATAACAACAG ATTTCCAGACTCCTGGACTCCCTCCCATCTGACACAAGGCTGGTCCTCCTGAATGCCAT CTACCTGTCTGCTAAGTGGAAGACCACATTTGACCCCAAAAAGACAAGGATGGAACCC TTCCACTTCAAAAACCTCAGTGATCAAAGTCCCCATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTG TGGCCCATTTTATTGATCAGACCCTGAAGGCCAAGGTGGGCCAGCTCCAGCTTTCCAC AACCTCAGCCTTGTGATTCTGGTGCCCCAGAACTTGAAGCACAGACTGGAGGACATGG AGCAAGCCCTGAGCCCCAGTGTCTTCAAGGCAATCATGGAGAACTTGAGATGTCCAA ATTCAGCCCCTCTGCTCACTCTCCCCAGAATCAAGGTCACCACCTCCCAAGATATGC TCTCAATTATGGAGAAGCTGGAGTTCTTTGATTTTTCCTATGATCTGAACCTGTGTGGCC TGAAGATCCAGACCTCCAAGTCTCTGCCATGCAGCACCAGACAGTGTTGGAGCT CACAGAACTGGGGTGGAAAGCCGCTGCTGCCCTCAGCCATCAGTGTGGCTAGGACCCTG TTGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCCTTTCTCTTTGTGCTGTGGGACCAGCAACACAAGTT CCCAGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGACCCAAGGGCCTGA</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
(配列番号 13)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA17	
<p>ATGGCATCCCGCCTGACCCCTCCTCACCCCTGCTTCTGCTCCTGCTGGCTGGAGATAGGGC CTCCAGCAACCCCAATGCAACCAGCAGCTCCAGCCAAGACCCTGAGTCCCTGCAAGAC AGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACCACTGTGATTTCCAAGATGCTGTTTGTGGAACCCA TCCTGGAAGTGAGCAGCCTCCCAACAACCAACAGCACCACCAATAGTGCCACAAAAAT TACAGCCAATACCACAGATGAGCCTACCACTCAGCCTACAACAGAACCCACCACCCAG CCTACCATCCAGCCGACCCAGCCAACCACACAGCTCCCCACTGACTCCCCACACAGCC CACCCTGGCTCCTTCTGCCCTGGACCTGTGACTCTGTGCTCTGACCTGGAATCTCACTC CACTGAGGCTGTGCTGGGGGATGCTCTGGTGGATTTTTCCCTCAAGCTCTACCATGCCT TCTCTGCCATGAAGAAGGTGGAGACCAACATGGCCTTTTCTCCCTTTTCCATTGCCAGC CTCCTGACCCAAGTGCTCCTGGGAGCTGGGGAGAACACCAAGACCAACCTTGAGAGCA TTCTGTCTACCCCAAGGACTTTACCTGTGTGCACCAAGCCCTGAAAGGCTTCACCACC AAAGGGGTGACCTCTGTCTCCAGATCTTCCACAGCCCTGATCTGGCCATTAGGGACAC CTTTGTCAATGCTTCCAGAACTCTCTATTCTTCCCTCCCACGGGTCTCTCCAACAATTC AGATGCCAACCTGGAGCTGATCAACACCTGGGTGGCCAAAACACAAACAACAAGATC TCAAGGCTCCTGGACAGCCTCCCCAGTGACACACGGCTGGTGCTCCTGAATGCCATCTA CCTGTCTGCCAAGTGGAAGACCACTTTTGACCCAAAAAAGACAAGGATGGAGCCCTTC CATTTCAAGAACAGTGTGATCAAGGTCCCCATGATGAATAGCAAGAAATACCCTGTTG CCCACTTCATTGATCAGACCCTGAAGGCCAAAGTGGGCCAGCTGCAGTTGTCCCACAA CCTCAGCCTGGTCATACTGGTGCCCCAGAACCTGAAGCATAGGCTGGAAGACATGGAA CAAGCACTGAGCCCCCTCAGTGTTCAAAGCTATCATGGAGAAGCTGGAGATGTCCAAAT TCCAGCCCACCCTGTTGACCCTGCCTAGGATCAAAGTCACCACCTCCCAAGATATGCTC TCAATAATGGAGAAACTGGAGTTCTTTGATTTCTCCTATGATCTCAATCTGTGTGGCCT GACTGAAGATCCAGACCTCCAAGTCTCAGCAATGCAGCACCAGACAGTCCTGGAGCTC ACAGAGACTGGTGTGGAGGCGGCAGCAGCCTCAGCCATCTCTGTGGCCAGAACCCTGC TGGTGTGTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAGCATAAGTTT CCTGTCTTCATGGGTAGGGTGTATGACCCCAGAGCCTGA</p>	<p>10 20 30</p>
(配列番号 14)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 4】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA18	
<p>ATGGCCAGCAGACTCACCCCTGCTGACCCTGCTCCTCCTGCTCCTGGCTGGGGACAGAGC CTCCTCCAACCCCAATGCAACCTCCTCCAGCTCCCAAGACCCTGAGTCCCTGCAAGATA GGGGAGAAGGCAAGGTTGCCACTACTGTCATAAGCAAGATGCTGTTTGTGTAACCCAT CTTGGAGGTGTCCAGTCTCCCCACCACAAACAGCACCACCAACTCTGCCACCAAGATC ACTGCCAATACCACAGATGAACCCACCCTCAGCCCACAACCTGAGCCCACCACCCAGC CAACCATACAGCCTACACAGCCAACAACCCAGCTGCCCCTGACTCCCCAACCCAGCC TACCACTGGCAGCTTCTGCCCTGGTCTGTACCCTCTGCAGTGACCTGGAAAGCCATA GCACAGAGGCTGTGCTGGGGGATGCTCTGGTGGACTTCTCCCTCAAACCTCTACCATGCT TTTTCTGCAATGAAGAAGGTGGAAACCAACATGGCCTTCAGCCCCTTCTCCATTGCCAG CCTCTTGACCCAAGTGCTCCTGGGAGCTGGAGAGAACAATAAGACTAATCTGGAGAGC ATCCTCTCCTACCCCAAAGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCCCTGAAGGGCTTCACCAC CAAAGGAGTGACCTCTGTCTCCCAGATCTTCCATTCCCCTGACCTGGCCATAAAGGGACA CCTTTGTGAATGCCTCTAGGACCCTGTACTCCAGCTCTCCTCGGGTCCTCAGCAACAAC TCAGATGCCAACCTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAAATAACCAATAACAAGA TTCCCCGCCTCCTGGATTCCCTGCCCTCTGACACACGCCTGGTGTCTCCTGAATGCCATCT ACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACCACCTTTGATCCCAAGAAAACCAGAATGGAGCCTTT CCACTTTAAGAATTCAGTCATTAAGTGCCCATGATGAATTCCAAGAAGTATCCTGTGG CTCACTTCATTGACCAGACCCTCAAGGCCAAGGTAGGTCAGCTCCAGCTGAGCCACAA CCTCAGCCTGGTGATCCTGGTCCCCCAGAACCTGAAACATAGGCTGGAGGACATGGAA CAAGCACTGTCCCCATCAGTCTTCAAGGCTATCATGGAGAAGCTGGAGATGAGCAAAT TCCAGCCCACACTGCTGACCTTGCCCTAGGATCAAGGTCACCACCAGCCAAGATATGCTC TCAATTATGGAGAAACTGGAATTCTTTGACTTTTCTATGACCTCAATCTGTGTGGCCTG ACAGAAGATCCAGATCTCCAAGTCAGTGCCATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAGCTGA CTGAAACTGGGGTGGAGGCAGCGGCAGCCTCAGCCATTTCTGTGGCAAGGACCCTGCT GGTGTGTTGAAGTGCAGCAGCCCTTTCTCTTTGTCTGTGGGATCAGCAGCACAAGTTTC CAGTGTTTCATGGGCCGGGTGTATGATCCAAGGGCCTGA</p>	<p>10 20 30</p>
(配列番号 15)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 5】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA19	
<p>ATGGCCTCCCGGCTGACCCCTTCTCACCCCTGCTCCTGCTGCTTCTGGCTGGGGACCGGGC CAGCAGCAACCCCAATGCTACCAGCTCTTCATCACAAGACCCTGAGAGCCTGCAAGAC AGAGGAGAAGGCAAGGTTGCCACTACTGTGATCAGCAAGATGCTCTTCGTGGAGCCCA TCCTGGAAGTGTCTTCTCTGCCACAACCAACTCCACCACAAATTCTGCCACCAAAATC ACAGCCAATACCACTGATGAACCCACCACTCAACCCACCACAGAGCCAACAACACAGC CAACCATCCAGCCTACCCAGCCTACCACCCAGCTTCCTACAGACAGCCCAACTCAGCCC ACAACCTGGCTCCTTCTGCCCTGGGCCTGTCACCCTGTGCTCTGACTTGGAAGCCACAG CACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTCTGGTGGACTTTTCTTTGAAGCTCTACCACGCCT TCAGTGCCATGAAGAAAGTAGAGACCAACATGGCATTTCAGCCCCTTTTCCATTGCTTCC CTGTTGACCCAAGTGCTCCTTGGAGCTGGAGAGAACTAAAACCAATCTTGAGTCCAT CCTCTCTACCCCAAAGACTTCACCTGTGTGCACCAAGCACTGAAAGGCTTCACAACCA AGGGGGTGACCTCAGTGTCCCAGATCTTCCATTCCCCAGACCTGGCCATTAGGGACACA TTTGTGAATGCAAGCAGAACTCTGTACAGCTCCAGCCCTAGGGTGTGTCCAACAATTC AGATGCCAACTTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAAACACAAACAACAAGATC TCCAGACTCCTGGACTCCCTCCCCAGTGACACCAGACTGGTTCTGCTGAATGCCATCTA CCTGTCAGCCAAGTGGAAGACCACCTTTGACCCCAAGAAGACAAGGATGGAACCATTTC CACTTTAAGAACAGTGTGCATCAAAGTGCCCATGATGAACAGCAAAAAGTACCCTGTGG CCCACTTCATTGATCAGACCCTCAAGGCAAAGGTGGGCCAGCTGCAGCTCTCCCACAA CCTCAGCCTTGTGATTCTGGTCCCCCAGAACCTGAAGCACAGACTGGAGGACATGGAA CAAGCCCTGTCTCCTTCAGTCTTCAAGGCCATCATGGAGAAGCTGGAGATGTCCAAGTT CCAGCCCCTCTCCTCACACTGCCTAGAATCAAGGTCACTACCTCTCAAGATATGCTGA GCATCATGGAGAAACTGGAGTTCTTTGATTTCTCCTATGACCTCAACCTGTGTGGCCTG ACAGAAGATCCAGATTTGCAAGTTTCTGCAATGCAGCACCAGACAGTGCTAGAGCTGA CTGAGACTGGTGTGGAAGCTGCTGCAGCCTCTGCTATCTCTGTGGCAAGAACCTTGCTG GTGTTTGAGGTGCAGCAGCCCTTCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAACACAAGTTTCC AGTGTTTCATGGGCAGAGTGTATGATCCCAGAGCCTGA</p>	<p>10 20 30</p>
(配列番号 16)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 6】

例示的なコドン最適化 SERPING1 配列	
HA20	
<p>ATGGCATCCAGACTCACACTGCTCACTCTGCTGCTTCTGTTGCTGGCTGGAGACCGGGC CTCCAGCAACCCCAACGCCACTTCTTCCTCCAGTCAAGATCCTGAGAGTCTCCAAGACA GAGGAGAAGGCAAGGTTGCTACCACTGTGATTTCCAAGATGCTCTTTGTGGAGCCCATC TTGGAAGTGAGCTCCCTGCCTACCACCAATTCCACCACAAATTCAGCCACCAAATCAC CGCCAACACTACAGATGAGCCAACCACCCAGCCCACGACAGAGCCTACAACCTCAGCCC ACCATCCAGCCTACTCAACCAACAACACAGCTCCCCACAGACAGCCCCACCCAGCCAA CTACTGGCTCCTTCTGCCCTGGGCCCGTGACCCTCTGCAGTGACCTTGAGAGCCACAGC ACCGAGGCTGTGCTGGGAGATGCTCTGGTGGACTTTTCTCTGAAGCTGTACCATGCTTT CTCTGCAATGAAGAAAGTAGAGACCAACATGGCCTTCAGTCCCTTTTCCATTGCCAGCC TGCTGACCCAAGTGCTCCTGGGCGCTGGGGAGAACAACAAAACCAACCTGGAGTCCAT CCTCTCTACCCCAAGGATTTACCTGTGTGCACCAAGCCCTGAAGGGCTTCACAACCA AGGGGGTACCTCTGTGTCCAGATCTTCCATTCCCCAGACCTGGCCATCAGAGACACC TTCGTGAATGCTTCCCGCACCCCTCTACAGCAGCTCTCCTCGAGTGCTATCCAACAATTCT GATGCCAATCTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCAAAGAATACAAACAACAAGATCA GCCGGCTGCTGGACTCCCTCCCTTCTGACACAAGGCTGGTCCCTCCTGAATGCCATCTAC CTGTCTGCCAAGTGGAAGACCACATTTGATCCCAAAAAGACAAGAATGGAACCATTCC ACTTTAAGAACTCCGTGATCAAAGTCCCCATGATGAACAGCAAGAAGTACCCTGTGGC CCACTTCATTGATCAGACCCTGAAAGCCAAAGTGGGCCAGCTGCAGCTTTCCCACAACC TGTCCTTGGTCACTCCTGGTGCCCCAGAACCTCAAGCACCGCCTGGAAGATATGGAACA AGCACTCAGCCCATCTGTCTTCAAGGCCATTATGGAGAACTGGAGATGTCCAAATTCC AGCCCCTCTCCTCACCCCTGCCCAGAATCAAGGTGACTACCAGCCAAGACATGCTGAG CATCATGGAGAAGCTCGAGTTCTTTGACTTCTCCTATGACCTCAACTTGTGTGGCCTGA CTGAGGACCCTGATCTGCAAGTCAGTGCCATGCAGCACCCAGACAGTGTGGAGCTGAC AGAACTGGTGTGGAAGCTGCTGCAGCCTCTGCTATCTCAGTGGCTCGGACCTTGCTTG TGTTTGAGGTGCAGCAACCCCTCCTGTTTGTCTGTGGGACCAGCAGCATAAGTTTCCA GTGTTTCATGGGCCGGGTGTATGATCCAAGAGCCTGA</p>	<p>10 20 30</p>
(配列番号 17)	

10

20

30

40

50

【表 2 - 17】

3XCRM8	
GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACA GGGGCTAAGTCCACCGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCCAGTTA TCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACCGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCA AGGTCACCCCAGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCAC	
(配列番号 18)	10
MVM イントロン	
CTAAGGTAAGTTGGCGCCGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATT ACCTTTTTTACAGGCCTG	
(配列番号 19)	
SERPING1 エクソン 1-イントロン 1-部分的エクソン 2	
CTGATTTACAGGAACTCACACCAGCGATCAATCTTCCTTAATTTGTAAGTGGGCAGTGT CCCGGGCCAGCCAATAGCTAAGACTGCCCCCCCCGCACCCACCCTCCCTGACCCCTGGG GGACTCTCTACTCAGTCTGCACTGGAGCTGCCTGGTGACCAGAAGTTTGGAGTAGGTTT GGTGCTGGGCAGGGGTGGGGAGTAGGGTGGAAAGCATGGAGTGAAGAGGTCTAGGGA GGGGTCTCCTCACCCCGCCTTCTGCCCCCTTGATCTCGGGGTCTCTATAGGCTT GCTTCCACCTGGGACTTCTGCCTCCTCCTACCCAGCCCCCTCCCGCCTCAGGCCGTGTGT GCTCAGCCCCCAGGACCTCCCCCACCCTCCTGCGCCTCTGGCCTCATTGTTTGGTTAAAGC AGGACCCCTCCCCCTCCCACCACCTCCCCTCCGACTGAACAGATGGACAGAGACCCG GGCCACGGGGAGAGGAAGGGCCAGCCGGTGCCGGAAAGGGAAGCGGTTTGGGGAA AACAAAACAGAGGGAGGAGCCAGGGAGAAGGTGGCCCCAGGAGGGAGGAGGGGA ATTGCTAAGAGGGACTGGGGCCTGAGACGGAATGGGGGCGGGCCCCGGGCGGGGTG GGGGCCCTGGGCTCCCAGGGTGGGAGCTGGCTCCGAGGCTGGCTGGCTCCGCAGGTC CGCTGACGTCGCCGCCAG	20
(配列番号 20)	30
BGHpA	
CCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGC CCCTCCCCGTGCCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAA AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGT GGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAA	
(配列番号 21)	40

【表 2 - 1 8】

WPRE WT	<p>AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC CGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGA GTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGCTGACGCAACC CCCCTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCC CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGG GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTC CATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGT CCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGG CCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTC CCCGCCTG</p> <p>(配列番号 22)</p>	
WPRE3	<p>AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC CGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGA ACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGAC AATCCGTGGTGT</p> <p>(配列番号 23)</p>	
WPREmut6delATG	<p>GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTTTG TTGCTCCTTTTACGCTTTGTGGATACGCTGCTTTATTGCCTTTGTATCTTGCTATTGCTT CCCGTTTGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTGGAGG AGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGCTGACGCAAC CCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCC CCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGG GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAATCATCGTCCTTT CCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGT CCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGG CCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTC CCGCATCGGACTAG</p> <p>(配列番号 24)</p>	

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 9】

CRE4	10
<p>GAGTTAATGTGTAATGAGACGGGGAGAAAACAGGAGAGCCCAGAATGACCTGGATGC TGATCACTGAACATACCCTACCCCAGTAAAACAAATTCAGAAAACAGCTTCCGCCCC TCCCCTCCAATGGAGGGCTCTGGCAGGAAAAGAGGTGAATAAGAGGCTTCTACCAGG GTAAAGGTTGAAGGCACCTGGTCATTTGATCACCTTATCAGTTCTAGGCAGTGATTAGC CAATATTGAGTCAGCAGGGGCAATAGCCCTGGCCCTTGTCTCACTCCTGTTGGGGGTGG GGGAGGGGGAGAGGTACATTCCCAGGTTCAAAGCATTGGGTGAAATCAGTTAAATAG ATATCAGAAGCTTTTGTATCTTTCACCCCTTTTGCCCCCAAGCATACTCGCTGAGTATGT GGAACATTCTGAGGGT</p> <p>(配列番号 25)</p>	10
CRE6	20
<p>AGGGGGGCCCTGGGGCTGACAGGGACTGGAAGCTCTGAGCTGGCCAGAGGGATGTTG CAATCCTGCCAGGGTCTTGTCTATGCTGTCTTTTCACAACCATCCCCCTACTGCCAGGC TGACACGTGGTTGCGGGGGCACAAGGCCAGCCAACCTAGAGTCTGAGGCTAGGCGGAG GACACCCTCCCCACCAGCTGCCAGGGTCACTGGCGGTCAAAGGCAGCTGGTGGGGAAG GCATTGGACTCCAGCCTTGGGGGACGGATGTAG</p> <p>(配列番号 26)</p>	20
hTTR	30
<p>AAATGACCTATTAAGAATATTTTCATAGAACGAATGTTCCGATGCTCTAATCTCTCTAGA CAAGGTTTCATATTTGTATGGGTTACTTATTCTCTCTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGA ATCAGCAGGTTTGCAGTCAGATTGGCAGGGATAAGCAGCCTAGCTCAGGAGAAGTGAG TATAAAAGCCCCAGGCTGGGAGCAGCCATCACAGAAGTCCACTCATTCTTGGCAGG</p> <p>(配列番号 27)</p>	30

40

50

【表 2 - 20】

hTTR、野生型 mTTR 及び改変 mTTR(Costa et al. 1991)		
hTTR	-----aaatgacctattaagaatatttcatagaacgaatggtccgatgctc	46
mod_mTTR	-----Gtctgtctgcacatttctgtagagcgagtgttccgatactc	40
wt_mTTR	ggtagctctagaggatccccgtctgtctgcacatttctgtagagcgagtgttccgatactc *	180
hTTR	taatctctctagacaagggttcatatttgtatgggttacttattctctctttgttgactaa	106
mod_mTTR	taatctccctaggcaagggttcatattttaggttacttattctctctttgttgactaa	100
wt_mTTR	taatctccctaggcaagggttcatattttaggttacttattctctctttgttgactaa ***** *	240
hTTR	gtcaataatcagaatcagcaggtttgcagtcagattggcagggataagcagcctagctca	166
mod_mTTR	gtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcagggatcagcagcctgggttg	160
wt_mTTR	gtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcagggatcagcagcctgggttg ***** *	300
hTTR	ggagaagtgagtataaaagccccaggctggg-agcagccatcacagaagtccactcattc	225
mod_mTTR	gaaggaggggtataaaagccccttcaccaggagaagccgtcacacagatccacaagctc	220
wt_mTTR	gaaggaggggtataaaagccccttcaccaggagaagccgtcacacaga----- *	349

(mod_mTTR:配列番号 28;wt_mTTR:配列番号 29)

10

20

【 0 0 7 8 】

コドン最適化SERPING1配列(HA03、HA04、HA05、及びHA06)と野生型SERPING1配列(HA01)との配列同一性、及び1つのコドン最適化SERPING1配列と他のコドン最適化配列との配列同一性を以下の表3に示す。

【表 3】

表3：野生型とコドン最適化SERPING1配列の配列同一性

SERPING1 のコドン最適化:配列同一性				
	HA04	HA03	HA06	HA05
HA01	97	83	90	93
HA04		84	92	96
HA03			91	87
HA06				95

30

【 0 0 7 9 】

疾患治療のためのC1-INHをコードするrAAVベクターの使用

本明細書に記載されるのは、C1-INH欠損に関連する疾患を治療する方法である。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるrAAVベクターは、C1-INH欠損を有する対象、例えば、HAEに罹患している患者を治療するのに好適である。治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを投与することを含む。

40

【 0 0 8 0 】

本明細書に記載されるrAAVベクターは、C1-INHの欠損または障害に関連する任意の疾患を治療するために使用することができる。

【 0 0 8 1 】

50

いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、それを必要とする対象に投与した後、エピソームのままである。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、それを必要とする対象に投与した後、エピソームのままではない。例えば、いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、対象のゲノムに組み込まれる。そのような組み込みは、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、ARCUSゲノム編集、及び/またはCRISPR-Casシステムなどの様々な遺伝子編集技術を使用することによって達成することができる。

【0082】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるrAAVベクターを含む医薬組成物は、それを必要とする対象に使用される。本発明のrAAVベクターまたは粒子を含有する医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体を含有する。好適な薬学的担体の例は、当該技術分野においてよく知られており、リン酸緩衝生理食塩水、水、水中油エマルションなどのエマルション、様々な種類の湿潤剤、無菌溶液などが含まれる。医薬組成物は、凍結乾燥された形態であってよい。そのような担体は、従来の方法によって配合することができ、治療上有効な量で対象に投与される。

10

【0083】

rAAVベクターは、それを必要とする対象に好適な経路を介して投与される。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、静脈内、腹腔内、皮下、または皮内経路によって投与される。一実施形態において、rAAVベクターは、静脈内投与される。実施形態において、皮内投与は、「遺伝子銃」またはバイオリスティック粒子送達システムの使用による投与を含む。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、非ウイルス性脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、rAAVベクターを含む組成物は、1つ以上の希釈剤、緩衝液、リポソーム、脂質、脂質複合体を含み得る。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、マイクロスフェアまたはナノ粒子、例えば、脂質ナノ粒子または無機ナノ粒子内に含まれる。

20

【0084】

いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後約1~6週間の時点で対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、約1週間の時点で対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、約2週間の時点で対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、約3週間の時点で対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、約4週間の時点で対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、約5週間の時点で対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、約6週間の時点で対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後約1~6週間の時点で対象の肝細胞中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後7週間を超えて、対象の肝細胞中で検出可能である。

30

【0085】

いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、または10年、対象の血漿中で検出可能である。したがって、いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも3ヶ月、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも6ヶ月、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも12ヶ月、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも2年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも3年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実

40

50

施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも4年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも5年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも6年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも7年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも8年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも9年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、少なくとも10年、対象の血漿中で検出可能である。いくつかの実施形態において、機能的C1-INHは、rAAVベクターの投与後、対象の残りの人生の間、対象の血漿中で検出可能である。

10

【0086】

いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、静脈内送達された精製C1-INHタンパク質の投与後に認められる場合と同じ程度の活性型C1-INHが産生される。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、静脈内送達された精製C1-INHタンパク質の投与と比較して、より多くの活性型C1-INHが産生される。

【0087】

20

いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが増加する。いくつかの実施形態において、C1-INHの増加は、対象の血漿中で検出される。いくつかの実施形態において、C1-INHの増加は、対象の肝臓組織中で検出される。いくつかの実施形態において、C1-INHの増加は、胆嚢、脾臓、卵巣、膀胱、脂肪、胎盤、肺、前立腺、心臓、リンパ節、及び子宮内膜を含む1つ以上の組織/器官で検出され得る。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、SERPING1を含むrAAVを投与する前の対象のC1-INHベースラインレベルと比較して、対象のC1-INHが約95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、または約10%増加する。したがって、いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約95%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約90%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約85%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約80%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約75%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約70%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約65%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約60%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約55%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約50%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約45%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約40%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約35%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対象のC1-INHが約30%増加する。いくつかの実施形態において、SERPING1を含むrAAVを投与すると、対

30

40

50

象の C 1 - I N H が約 2 5 % 増加する。いくつかの実施形態において、S E R P I N G 1 を含む r A A V を投与すると、対象の C 1 - I N H が約 2 0 % 増加する。いくつかの実施形態において、S E R P I N G 1 を含む r A A V を投与すると、対象の C 1 - I N H が約 1 5 % 増加する。いくつかの実施形態において、S E R P I N G 1 を含む r A A V を投与すると、対象の C 1 - I N H が約 1 0 % 増加する。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態において、対象に A A V ベクターを投与した後に循環中で検出可能な機能的 C 1 - I N H のレベルは、S E R P I N G 1 を含む r A A V を投与する前の対象で検出可能な機能的 C 1 - I N H の量よりも約 2 ~ 2 0 倍多い。

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態において、対象に A A V ベクターを投与した後の検出可能な活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルを満たすか、またはそれを超えるものである。いくつかの実施形態において、r A A V ベクターの投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 2 ~ 3 5 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 2 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 3 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 4 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 5 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 6 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 6 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 7 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 8 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 9 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 1 0 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 1 5 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 2 0 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 2 5 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 3 0 倍である。いくつかの実施形態において、投与後における活性型 C 1 - I N H のレベルは、ヒト治療レベルの約 3 5 倍である。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態において、r A A V、S E R P I N G 1 ベクターは、対象ごとに単回投与として送達される。いくつかの実施形態において、対象には、最小有効用量 (M E D) が送達される。本明細書で使用される場合、M E D は、対象の C 1 - I N H レベルの増加をもたらす C 1 - I N H 活性を達成するのに必要な r A A V、S E R P I N G 1 ベクターの用量を指す。

【 0 0 9 1 】

ベクター力価は、ベクター調製物の D N A 含量に基づいて決定される。いくつかの実施形態において、定量的 P C R または最適化された定量的 P C R を使用して、r A A V、S E R P I N G 1 ベクター調製物の D N A 含量が決定される。一実施形態において、投与量は、約 1×10^{11} ベクターゲノム (v g) / k g 体重 ~ 約 2×10^{13} v g / k g である (端点を含む) 。

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態において、投与量は、少なくとも 5×10^9 v g / k g 以上である。

【 0 0 9 3 】

r A A V、S E R P I N G 1 ベクター組成物は、約 1.0×10^9 v g ~ 約 1.0×10^{15} v g の範囲内である量の複製欠損性ウイルスを含有する用量単位で製剤化することが

10

20

30

40

50

できる。本明細書で使用される場合、「投与量」という用語は、治療の過程で対象に送達される総投与量または単回（複数回）の投与で送達される量を指し得る。

【0094】

いくつかの実施形態において、投与量は、患者の血漿中C1-INHレベルを25%以上増加させるのに十分なものである。いくつかの実施形態において、rAAV SERPING1は、HAEの治療のための1つ以上の治療薬と組み合わせて投与される。

【実施例】

【0095】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以下の実施例から明らかである。しかしながら、実施例は、本発明の実施形態を示すものであり、限定ではなく、あくまで例示として提供されることを理解されたい。本発明の範囲に含まれる様々な変更形態及び改変形態は、実施例から当業者に明らかになるであろう。

10

【0096】

実施例1．ベクター設計

ヒトC1-エステラーゼインヒビター（C1-INH）のコーディング配列及びその変形形態を含むrAAV発現コンストラクト（rAAVベクター）を生成するための例示的な方法及び設計について、本実施例に記載する。本試験では、hSERPING1をヒトC1-INH（hC1-INH）のコーディング配列として使用し、組み換えAAVベクター（rAAV8）をベクターとして使用した。rAAVベクターの基本設計は、末端逆位反復（ITR）：5'-ITR及び3'-ITRで両端が挟まれた発現カセットを含む。これらのITRは、ベクター産生細胞において、AAV複製タンパク質であるRep及び関連因子によるベクターゲノムの複製及びパッケージングを媒介する。典型的に、発現カセットは、図1Aに示されるように、プロモーター、コーディング配列、polyAターミナル及び/またはタグを含有する。ヒトhC1-INHをコードする発現コンストラクトhSERPING1を設計し、標準的な分子生物学技術を使用して作製した。hSERPING1のコーディング配列をプロモーターhTTR（ヒトトランスサイレチンプロモーター）の下流に挿入した。更に、肝臓特異的シス作用調節モジュール（CRM）をプロモーターの上流に挿入し、イントロン配列をプロモーターの下流に挿入した。以下の実施例に示すように、高い形質導入レベルについて、この調節因子とプロモーターの組み合わせを試験した。次いで、この発現コンストラクトをAAVベクターにライゲートし、シーケンシングによって試験した。ベクターをウイルス粒子中にパッケージングし、保存した。

20

30

【0097】

別の実施形態において、コーディング領域の下流にWPRE配列を挿入した。このエレメントは、mRNA安定性を高める三次構造をもたらす。本明細書に記載される発現コンストラクトの模式図を図1Bに示す。上記スキームにより任意数の変形形態を行うことができる。

【0098】

コドン最適化コンストラクト

更に、SERPING1のコーディング配列を、コドン適応指標（CAI）、CpG部位数、GC含量、及び反復塩基配列などの複数のパラメーターに基づいてコドン最適化した。より頻繁に使用されるコドンを利用し、ベクターからの導入遺伝子産物の発現レベルを潜在的に高めるためには、高いCAIが好ましかった。免疫応答を誘起し得るCpGアイランド配列を減少させた。反復塩基も除去した。上記スキームにより任意数の変形形態を行うことができる。例えば、複数のプロモーターを使用してもよい。更に、調節領域、プロモーター、イントロン、及びエクソンの異なる組み合わせも企図することができる。

40

50

【表 4 - 1】

表 4：異なるコドン最適化SERP I N G 1 コーディング配列及び関連エレメントを含む異なる発現コンストラクトの例。

発現コンストラクト	コーディング配列	エンハンサー	イントロン	プロモーターエレメント	他のエレメント
Mコンストラクト (2つの配列)	野生型SERP I N G 1 コーディング配列 (HA 0 1)		SERP I N G 1 特異的イントロンまたはMV Mイントロン	h T T R	
Jコンストラクト (4つの異なる配列)	コドン最適化SERP I N G 1 (HA 0 3、HA 0 4、HA 0 5、及びHA 0 6)		MVMイントロン	h T T R	
Sコンストラクト (6つの異なる配列)	コドン最適化SERP I N G 1 (HA 0 6)	W P R E、W P R E 3、またはW P R E m u t 6 d e l A T G	MVMイントロン、またはエクソン1-イントロン1-部分的エクソン2	h T T R	

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

Nコンストラクト (5つの異なる配列)	コドン最適化 SERP IN G 1 (HA 0 6)		MVMイ ントロン	h T T R、h T T R m o d.、m T T R p r o、m T T Rエンハンサ ー、CAGプロ モーター、また はCMV/CB Aプロモーター	
Uコンストラクト (10個の異なる 配列)	最適化SER P IN G 1配 列 (HA 1 1、HA 1 2、HA 1 3 …HA 2 0)	WPRE m u t 6 d e l A T G	MVMイ ントロン	h T T R	
Pコンストラクト (6つの異なる配 列)	コドン最適化 SERP IN G 1 (HA 0 6)	WPRE m u t 6 d e l A T G	MVMイ ントロン	h T T R	CRE 4、また は/及び CRE 6

10

20

【0099】

ヒト血管性浮腫を治療するために設計された異なる発現コンストラクト (HAEコンストラクト) を表 4 に列挙し、図 2 A ~ 7 B に示した。Mコンストラクトは、概して、図 2 A に示され、2つのMコンストラクト (M01及びM01A) を図 2 B に示す。M01及びM01AのコンストラクトはいずれもヒトSERPING1野生型配列であるHA01配列を含む (対照コンストラクト)。HA01は、24のCpGを含み、GC含量53.4%である。M01は、イントロン: SERPING1エクソン1 - イントロン1 - 部分的エクソン2 (717bp) を含むが、M01Aは、MVM (77bp) イントロンを含む。

30

【0100】

Jコンストラクトは、概して、図 3 A に示され、4つのJコンストラクト: J01、J02、J03、及びJ04を図 3 B に示す。Jコンストラクトは、コドン最適化SERPING1配列である。J01は、HA03 SERPING1配列を含み、J02は、HA06 SERPING1配列を含み、J03は、HA05 SERPING1配列を含み、J04は、HA04 SERPING1配列を含む。

40

【0101】

Sコンストラクトは、概して、図 4 A に示され、9つのSコンストラクト: S01、S02、S03、S04、S05、S06、S07、S08、及びS09を図 4 B に示す。Sコンストラクトは、HA06 SERPING1配列、イントロン (MVMイントロンまたはエクソン1 - イントロン1 - 部分的エクソン2)、及びWPRE (WPRE3またはWPREmut6delATGのいずれか) を含む。

【0102】

Nコンストラクトは、概して、図 5 A に示され、9つのNコンストラクト: Nap tu

50

ne01、Naptune02、Naptune03、Naptune04、Naptune05、Naptune06、Naptune07、Naptune08、及びNaptune09を図5Bに示す。Nコンストラクトは、HA06SERPING1配列、及びhTTR、hTTRmod.、mTTRpro、mTTRエンハンサー、CAGプロモーター、またはCMV/CBAプロモーターなどの新規プロモーターエレメントを含む。

【0103】

Uコンストラクトは、概して、図6Aに示され、10個のUコンストラクト：U01、U02、U03、U04、U05、U06、U07、U08、U09、及びU10を図6Bに示す。Uコンストラクトは、コドン最適化配列及びWPREmut6delATGを含む。

10

【0104】

Pコンストラクトは、概して、図7Aに示され、6つのPコンストラクト：P01、P02、P03、P04、P05、及びP06を図7Bに示す。Pコンストラクトは、HA06SERPING1配列WPREmut6delATG、及び改変した骨格エレメントであるCRE4及び/またはCRE6を含む。

【0105】

実施例2．AAV8．SERPING1ベクターを媒介したグリコシル化された機能的hC1-INHのin vitro発現

本実施例は、hC1-INHのin vitro発現におけるAAV8．SERPING1ベクターの効力を示す。

20

【0106】

hC1-INHを発現するrAAVベクター(AAV8．SERPING1)または対照ベクター(陰性対照として)をHepG2細胞(肝臓細胞)にトランスフェクトし、72時間後に上清を回収した。rAAVベクターコンストラクトを図1Aに示す。血漿由来のhC1-INHサンプルを陽性対照として使用した。細胞上清中のhC1-INH発現を、標準的なウェスタンブロット分析を使用するイムノブロットで評価した。図8Aに示されるように、rAAVベクターで処理した細胞から得られた上清において、hC1-INHが検出された。本実施例の結果は、rAAVベクターからのhC1-INHの発現を示すものである。

【0107】

HepG2細胞中のhC1-INH発現レベルは、ELISAを使用して、上清中に存在するhC1-INHの量を測定することによって決定した。図8Bに示されるように、rAAVをトランスフェクトした細胞は、対照細胞と比較して、非常に多量のhC1-INHを発現した。本実施例による結果は、rAAVトランスフェクト細胞が機能的hC1-INHを発現することを示している。

30

【0108】

実施例3．AAV8．hSERPING1ベクターを媒介したin vivoにおけるhC1-INHの用量依存的発現

本実施例は、in vivoでのhC1-INHの用量依存的な発現におけるrAAV(すなわち、AAV8．hSERPING1)ベクターの効力を示す。

40

【0109】

in vivo発現を示すために、図2BでM01と示されているhC1-INHをコードするAAV8．hSERPING1ベクターをマウス(C57/bl/6)に静脈内注射した。3つの異なるベクター用量(1×10^{11} vg/kg、 4×10^{11} vg/kg、及び 4×10^{12} vg/kg)を評価した。各マウスに単回投与を行った。注射後14日目に血漿サンプルを採取した。

【0110】

血漿中のhC1-INHのレベルをモニタリングすることによって、rAAVの有効性を決定した。血漿中のhC1-INHのレベルは、正常マウスに存在するhC1-INHのレベルに対するパーセンテージで表した。結果を図9Aに示す。rAAVベクターを投

50

与したマウスは、hC1 - INHの用量依存的な発現を示した。4 × 10¹² v g / k gの用量でrAAVベクターを投与したマウス群は、臨床目標レベル（すなわち、220 μg / mL）に相当するレベルのhC1 - INHを発現した。

【0111】

更に、rAAVの形質導入効率及び転写効率について、ベクターをマウスに静脈内注射することによって決定した。3つの用量：1 × 10¹¹ v g / k g、4 × 10¹¹ v g / k g、及び4 × 10¹² v g / k gのうちの1つの用量でrAAVをマウス（C57 / b1 / 6）に投与し、4番目のマウス群にはビヒクルのみを投与した。rAAVベクターコンストラクトを図2BのM01として示す。注射後28日目に動物を殺し、肝臓を採取した。rAAVの形質導入効率及び転写効率を、ビヒクルのみを投与した群と比較した。結果を図9Bに示す。3つの全ての用量で、hSERPING1の有意な形質導入及び転写があったことが示されている。実際、hSERPING1 DNAをhSERPING1 DNAコピー / 細胞で表した場合、用量依存的に増加した形質導入が観察された。予想通り、ビヒクルのみを投与したマウスでは、hSERPING1の形質導入及び転写は見られなかった。

10

【0112】

本実施例による結果は、rAAV . AAV8 . hSERPING1ベクターがin vivoでC1 - INHを用量依存的に発現することを示している。この結果はまた、野生型マウスにおいて生理学的レベルのヒトC1 - INHが存在することも明らかにしている。

【0113】

コドン最適化の効果及びコドン最適化コンストラクトのスクリーニング

実施例4 . コドン最適化hSERPING1配列を含むrAAV8ベクターのin vivo有効性

本実施例は、血漿中でのC1 - INHの発現における、いくつかのコドン最適化rAAV8 . C1 - INHコンストラクトのin vivo有効性を示す。

【0114】

hSERPING1配列のコドン最適化がrAAV8ベクターのin vivo有効性に与える影響を試験するために、4つのコドン最適化コンストラクトを作製した。コドン最適化コンストラクトは、J01、J02、J03、及びJ04であった。M01A（野生型C1 - INH）またはコドン最適化C1 - INH配列のいずれかを含むrAAVベクターをマウス（C57 b1 / 6）に注射した。5つ全てのコンストラクトを図10Bに示す。4 × 10¹¹ v g / k gまたは2 × 10¹² v g / k gのいずれかのベクターをマウスに投与し、血漿サンプルをrAAVの投与前ならびに注射後7日目、14日目、及び28日目に採取した。用量反応については、J04のみを使用して評価した。本試験では、オスのマウスのみを使用した。血漿中のhC1 - INHのレベルは、正常マウスに存在するhC1 - INHのレベルに対するパーセンテージで表した。結果を図10A及び表5に示す。

30

【0115】

対照ベクター（野生型）を投与したマウスもコドン最適化コンストラクトを投与したマウスもhC1 - INHを発現した。異なるコンストラクトで、コドン最適化は、hC1 - INHを発現する能力に対して中程度の影響を与えることが示された。

40

【表 5】

表 5. 野生型SERPING1を含むベクターと比較した、コドン最適化SERPING1配列を含むrAAVによるhC1-INHの発現

群	条件	処置	ベクター用量	14日目における野生型と比較した発現倍率
A	対照ベクター	M01A	4×10^{11} vg/kg	1
B	試験	J01	4×10^{11} vg/kg	1.1
C	試験	J02	4×10^{11} vg/kg	1.5
D	試験	J03	4×10^{11} vg/kg	1.5
E	試験	J04	4×10^{11} vg/kg	1.2

10

【0116】

コドン最適化コンストラクトJ04は、図10Aに示されるように、試験全体を通して（すなわち、7日目、14日目、及び28日目）、hC1-INHを用量依存的に発現した。

20

【0117】

本実施例による結果は、コドン最適化により、コンストラクトの有効性が野生型（対照ベクター）よりも適度に改善することを示している。コドン最適化コンストラクトはまた、hC1-INHを用量依存的に発現する。本試験に基づいて、後続の生体試験にJ02を選択した。

【0118】

WPREの効果

実施例5. コドン最適化hSERPING1配列及びWPREを含むrAAV8ベクターのin vivo有効性

本実施例は、血漿中でのC1-INHの発現における、コドン最適化AAV8.C1-INH-co2配列を3つの異なるWPREと組み合わせて含むベクターのin vivo有効性を示す。

30

【0119】

異なるコドン最適化コンストラクト：(1) J02 (WPREエレメントなし)、(2) S07 (WPRE3含有)、及びS04 (WPREmut6delATG含有)を含むrAAVベクターをマウスに注射した。WPREを含むrAAVベクターを図1Bに示し、異なるコドン最適化コンストラクト及び関連エレメントを表4に列挙する。 4×10^{11} vg/kgのベクターをマウスに投与し、血漿サンプルをrAAVの投与前ならびに注射後7日目、14日目、及び28日目に採取した。血漿中のhC1-INHのレベルは、正常マウスに存在するhC1-INHのレベルに対するパーセンテージで表した。結果を図11に示す。

40

【0120】

WPREを含むコンストラクトを投与したマウスは、WPREを含まないコドン最適化コンストラクトと比較して、約2.5倍を超えるhC1-INHを発現した。

【0121】

本実施例による結果は、WPREを組み込むことにより、コドン最適化コンストラクトの有効性が改善することを示している。

【0122】

WPRE及びイントロンの効果

実施例6. HA06 (hSERPING1)配列、WPRE、及びイントロンを含むr

50

AAV8ベクターの*in vivo*有効性

本実施例は、血漿中でのhC1-INHの発現に関する、HA06(hSERPING1)配列、WPRE、及びイントロンを含むrAAV8ベクターの*in vivo*有効性を示す。

【0123】

HA06配列を含むrAAV8ベクターの*in vivo*有効性に対するWPRE及びイントロンの影響を試験するために、異なるWPREとイントロンの組み合わせを使用した。本試験で使用したイントロンは、MVMイントロンまたはエクソン1-イントロン1-部分的エクソン2のいずれかであり、使用したWPREは、WPRE3またはWPREmut6delATGのいずれかであった。本試験で使用した、異なる組み合わせのWPRE、イントロン、及びコドン最適化hSERPING1配列を含む組み換えAAVベクターを図12Bに示す。4×10¹¹vg/kgまたは2×10¹²vg/kgのいずれかのベクターをマウス(C57bl/6;オス)に投与し、血漿サンプルをrAAVの投与前ならびに注射後7日目、14日目、及び28日目に採取した。血漿中のhC1-INHのレベルは、正常マウスに存在するhC1-INHのレベルに対するパーセンテージで表した。結果を図12Aに示す。

10

【0124】

MVMイントロン、HA06(SERPING1)配列及びWPRE3を含むコンストラクト(例えば、S07)を投与したマウスは、同じ用量で他のコンストラクトを投与した残りの動物と比較して、より多くのhC1-INHを発現した。J04を2×10¹²vg/kgで投与したマウスが最も高いhC1-INH発現を示した。

20

【0125】

本実施例による結果は、MVMイントロン及びWPRE3を組み込むことにより、HA06(SERPING1)配列の有効性が改善することを示している。

【0126】

低ベクター用量及び高ベクター用量でのWPRE及び代替プロモーターエレメントの効果
実施例7. HA06(hSERPING1)配列、WPRE及び代替プロモーターを含むrAAV8ベクターの*in vivo*有効性

本実施例は、血漿中における、HA06(hSERPING1)配列、WPRE及び新規プロモーターを含むコンストラクトの*in vivo*有効性を示す。

30

【0127】

WPRE及び他の新規プロモーターがrAAV8ベクターの*in vivo*有効性に与える影響を試験するために、異なる新規プロモーターエレメントを含む異なるコンストラクトを使用した。7つの異なるコンストラクト(J02、J04、S04、N01、N02、N03、及びC22)を試験した。本試験に含まれるC22は、対照ベクターである。7つ全てのコンストラクトを図13Bに示す。3つの用量: 4×10¹¹vg/kg、1.2×10¹³vg/kg、及び2×10¹²vg/kgのうちの1つのベクターをマウス(C57bl/6;オス)に投与し、血漿サンプルをrAAVの投与前ならびに注射後7日目、14日目、及び28日目に採取した。血漿中のhC1-INHのレベルは、正常マウスに存在するhC1-INHのレベルに対するパーセンテージで表した。結果を図13Aに示す。

40

【0128】

HA06(SERPING1)配列及びWPREmut6delATGを含むコンストラクト(例えば、S04)を投与したマウスは、同じ用量で他のコンストラクトを投与した残りの動物と比較して、より多くのhC1-INHを発現した。J04を1.2×10¹³vg/kgで投与したマウスが最も高いhC1-INH発現を示した。本実施例による結果は、WPREmut6delATGを組み込むことにより、HA06(SERPING1)配列の有効性が改善することを示している。

【0129】

別の実施例において、2つの用量: 2×10¹²vg/kg及び2×10¹³vg/kg

50

でS04をマウス(C57b1/6;オス)に投与し、血漿を14日目及び28日目に採取した。もう1群のマウスには、対照として、緩衝液を投与した。結果を図13Cに示す。

【0130】

本実施例による結果は、S04が両時間点でhC1-INHを用量依存的に発現することを示している。

【0131】

コドン最適化の効果

実施例8.コドン最適化hSERPING1配列を含むコンストラクトを含むrAAV8ベクターのin vivo有効性

本実施例は、血漿中における、コドン最適化hSERPING1配列を含むコンストラクトを含むrAAV8ベクターのin vivo有効性を示す。

【0132】

10個の異なるコドン最適化コンストラクト(U01、U02、U03、U04、U05、U06、U07、U08、U09、及びU10)を調製した。10個全てのコンストラクトを図14Bに示す。全てのコドン最適化コンストラクトのin vivo有効性をS04とともに試験した。コンストラクトS04を図4Bに示す。2×10¹²vg/kgのベクターをマウス(C57b1/6;オス)に投与し、血漿サンプルをrAAVの投与前及び注射後28日目に採取した。血漿中のhC1-INHのレベルは、正常マウスに存在するhC1-INHのレベルに対するパーセンテージで表した。結果を図14Aに示す。

【0133】

U06を投与したマウスは、S04を同じ用量で投与した群と同等のhC1-INHを発現した。

【0134】

長期試験における中用量でのWP RE及び代替プロモーターエレメントの効果

実施例9.HA06(hSERPING1)配列、WP RE及び代替プロモーターを含むコンストラクトを含むrAAV8ベクターのin vivo有効性

本実施例は、血漿中における、HA06(hSERPING1)配列、WP RE及び新規プロモーターエレメントを含むコンストラクトを含むrAAV8ベクターのin vivo有効性を示す。

【0135】

WP RE及び新規プロモーターがrAAV8ベクターのin vivo有効性に与える影響を試験するために、WP RE及び新規プロモーターエレメント含むまたは含まない異なるコンストラクトを使用した。7つの異なるコンストラクト(J02、S03、S04、S06、S07、N04、及びN05)を試験した。7つ全てのコンストラクトを図15Bに示す。2×10¹²vg/kgの中用量をマウス(C57b1/6;オス)に投与し、血漿サンプルをrAAVの投与前ならびに注射後7日目、14日目、28日目、49日目、70日目、91日目、112日目、133日目、152日目、及び175日目に採取した。血漿中のhC1-INHのレベルは、正常マウスに存在するhC1-INHのレベルに対するパーセンテージで表した。結果を図15Aに示す。

【0136】

MVMイントロンを含むコンストラクト(例えば、S07)を投与したマウスは、MVMを含まないコンストラクト(例えば、S06)を投与した群と比較して、より多くのhC1-INHを発現した。加えて、短いWP REであるWP RE3を含むコンストラクト(例えば、S06及びS07)を投与した群は、改変したWP REであるWP RE mut 6 del ATGを含むコンストラクト(例えば、S03及びS04)を投与した群と比較して、より多くのhC1-INHを発現した。

【0137】

本実施例による結果は、MVMイントロン及び短い形態のWP REであるWP RE3を

10

20

30

40

50

組み込むことにより、HA06 (SERPING1) 配列の有効性が改善することを示している。MVMイントロンとWPRE3の両方を組み込んだコンストラクトS07は、最大の有効性を示し、175日間にわたって、hC1-INHを発現した。

等価物及び範囲

【0138】

当業者であれば、通常の実験を使用するだけで、本明細書に記載される本発明の具体的な実施形態の等価物を数多く認識または確認することができるであろう。本発明の範囲は、上述の「発明を実施するための形態」に限定されるものではなく、以下の特許請求の範囲に記載される。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

10

(項目1)

AAV8カプシドと、C1インヒビター(C1-INH)をコードするコドン最適化SERPING1配列とを含む、組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクター。

(項目2)

前記C1-INHをコードするコドン最適化SERPING1配列が、配列番号2に対して、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有する配列を含む、項目1に記載のrAAVベクター。

(項目3)

前記C1-INHをコードするコドン最適化SERPING1配列が、配列番号2と同一の配列を含む、項目2に記載のrAAVベクター。

20

(項目4)

前記ベクターが、肝臓特異的プロモーターを更に含む、項目1に記載のrAAVベクター。

(項目5)

前記肝臓特異的プロモーターが、トランスサイレチンプロモーター(TTR)である、項目4に記載のrAAVベクター。

(項目6)

前記ベクターが、ユビキタスプロモーターを更に含む、先行項目のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

(項目7)

前記ベクターが、次のうちの1つ以上：5'及び3'末端逆位反復、配列上流のイントロン、ならびにシス作用調節モジュール(CRM)を更に含む、先行項目のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

30

(項目8)

前記ベクターが、WPRE配列を更に含む、先行項目のいずれか1項に記載のrAAVベクター。

(項目9)

前記WPRE配列が改変されている、項目8に記載のrAAVベクター。

(項目10)

前記WPREがmut6delATGの改変を含有する、項目9に記載のrAAVベクター。

40

(項目11)

前記イントロンが、マウス微小ウイルス(MVM)またはSV40イントロンである、項目7に記載のrAAVベクター。

(項目12)

前記CRMが肝臓特異的CRMである、項目7に記載のrAAVベクター。

(項目13)

前記CRMがCRM8である、項目7に記載のrAAVベクター。

(項目14)

前記ベクターが少なくとも3つのCRMを含む、項目7に記載のrAAVベクター。

50

(項目15)

AAV8カプシドと、rAAVベクターとを含む、組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)であって、前記ベクターは、

- a. 5'末端逆位反復(ITR)、
- b. シス作用調節モジュール(CRM)、
- c. 肝臓特異的プロモーター、
- d. マウス微小ウイルス(MVM)、
- e. C1インヒビター(C1-INH)をコードするSERPING1配列、
- f. ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)、及び
- g. 3' ITR

を含む、前記rAAV。

10

(項目16)

前記SERPING1配列が、野生型配列またはコドン最適化配列である、項目15に記載のrAAV。

(項目17)

前記コドン最適化SERPING1配列が、配列番号2と、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性を有する、項目16に記載のrAAV。

(項目18)

遺伝性血管浮腫(HAE)を有する対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、先行項目のいずれか1項に記載のrAAVを投与することを含む、前記方法。

20

(項目19)

遺伝性血管浮腫(HAE)を有する対象を治療する方法であって、それを必要とする対象に、AAV8カプシドと、C1インヒビター(C1-INH)をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーターとを含む組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを投与することを含み、投与することにより、前記対象のC1-INH酵素活性が増加する、前記方法。

(項目20)

前記C1-INHが、前記対象の血漿中で検出される、項目19に記載の方法。

(項目21)

前記C1-INHが、前記対象の肝臓中で検出される、項目18~20のいずれか1項に記載の方法。

30

(項目22)

C1-INHが、単回投与後、少なくとも30、60、90、120、150、180日またはそれ以上、維持される、項目18~21のいずれか1項に記載の方法。

(項目23)

C1-INH活性が、前記rAAVベクターの投与後、前記対象に存在する、項目18~22のいずれか1項に記載の方法。

(項目24)

前記対象が、発作前のレベルに回復したC4レベルを有する、項目23に記載の方法。

40

(項目25)

前記AAVが静脈内投与される、項目18~24のいずれか1項に記載の方法。

(項目26)

前記AAVが髄腔内投与される、項目18~24のいずれか1項に記載の方法。

(項目27)

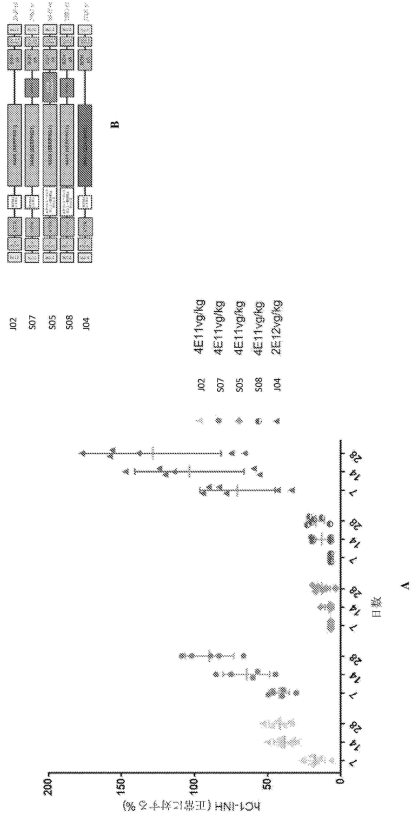
前記AAVが少なくとも約 5×10^9 -vgの用量で投与される、項目25または26に記載の方法。

(項目28)

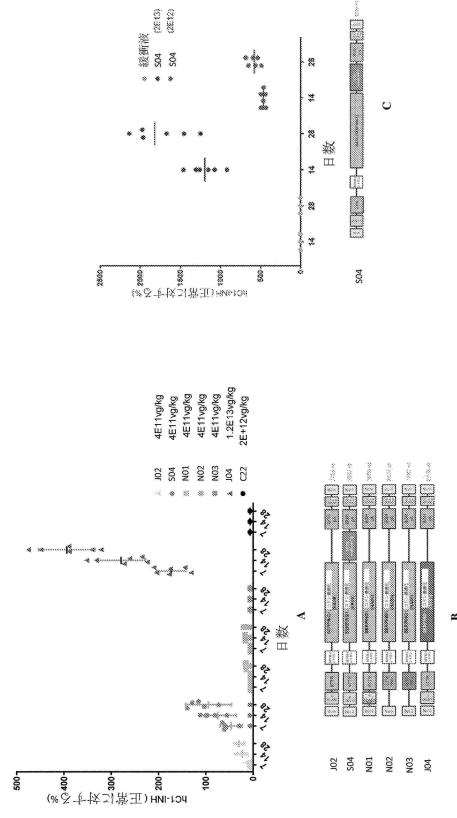
前記rAAVの前記投与が免疫応答を誘起しない、項目18~27のいずれか1項に記載の方法。

50

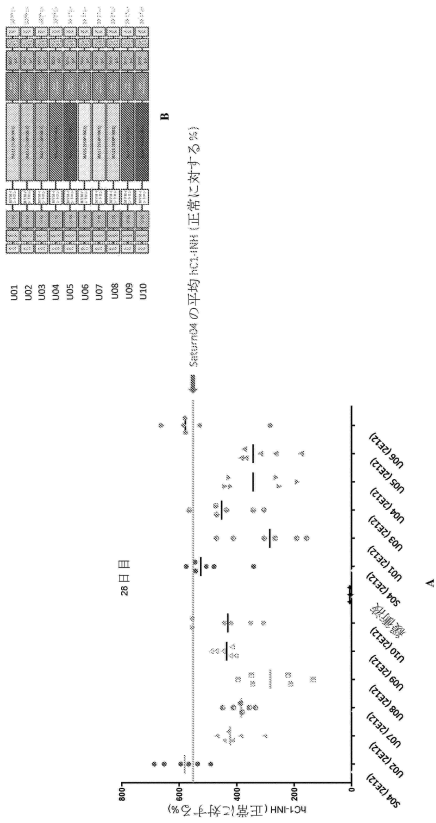
【図 1 2】



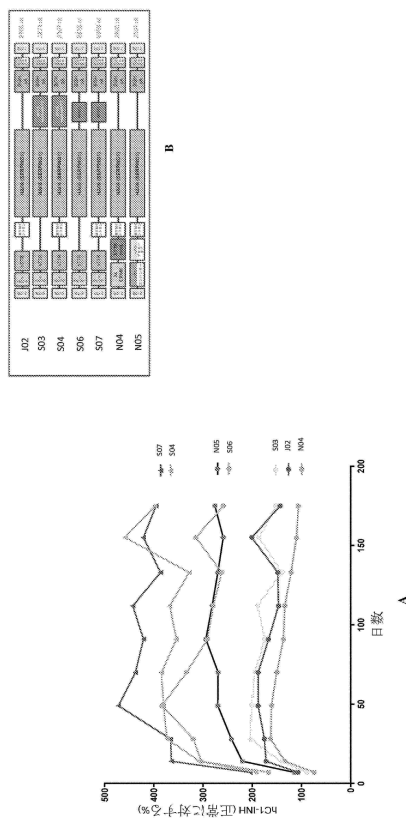
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007659550000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113		Z

弁護士 山本 健策

- (72)発明者 クラグマン, マティアス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0,
シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ホーリング, フランチスカ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0,
シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 レングラー, ヨハネス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0,
シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ドゥイヤール, パトリース
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0,
シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 シェイフリンガー, フリードリヒ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0,
シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ロッテンシュタイナー, ハンスペーター
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0,
シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ガンガダラン, バギラス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0 0,
シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 田ノ上 拓自

- (56)参考文献 特表2018-516571(JP, A)
国際公開第2019/143272(WO, A1)
特表2018-513678(JP, A)
Allergy, 2019年03月19日, Vol.74, pp.1081-1089, DOI: 10.1111/all.13582
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 7 / 0 1
A 6 1 P 9 / 0 0
A 6 1 K 3 5 / 7 6
A 6 1 P 4 3 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q